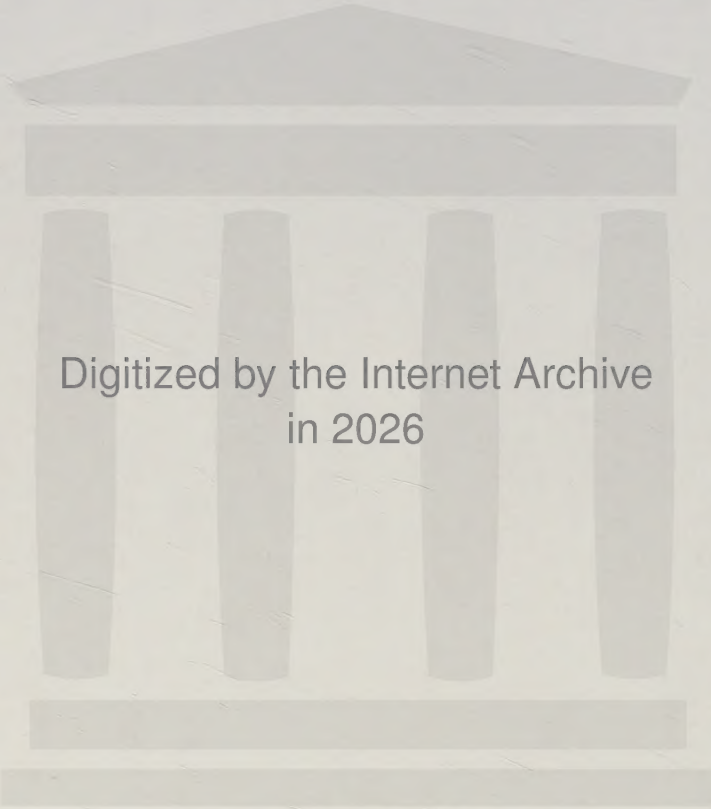


**ZUR SCHUTZWIRKUNG KLEINMOLEKULARER PROTEIN-
ANTIGENE DER OBERFLÄCHE VON SALMONELLA
GALLINARUM GEGEN DIE SALMONELLA THYPHIMURIUM
VAR. COPENHAGEN INFektion DER TAUBE
(COLUMBA LIVIA, GMEL. 1789 VAR.DOM.)**

UWE KIRSCH

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0091

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof.Dr.Josef Kösters

Zur Schutzwirkung kleinmolekularer
Proteinantigene der Oberfläche von *Salmo-*
nella gallinarum gegen die *Salmonella typhi-*
murium var. *copenhagen* Infektion der Taube
(*Columba livia*, Gmel. 1789 var.dom.)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Uwe Kirsch
aus Karlsruhe

München 1986¹

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

in Dankbarkeit

<u>Inhaltverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literatur	3
2.1 Die bakterielle Zellwand	3
2.1.1 Die Lipopolysaccharide	3
2.1.2 Die Proteine	4
2.1.2.1 Die Geißeln	4
2.1.2.2 Die Fimbrien/Pili	4
2.1.2.3 Die Haupt- und Nebenproteine	5
2.2 Der Erreger	7
2.3 Vorkommen und Verbreitung	7
2.4 Pathogenese	8
2.5 Immunitätsmechanismen	9
2.5.1 Unspezifische Resistenz	9
2.5.2 Spezifische Resistenzmechanismen	11
2.5.2.1 Humorale Faktoren	11
2.5.2.2 Zellulär vermittelte Resistenz	11
2.5.2.3 Die Schleimhaut vermittelte Immunität	11
2.6 Immunisierungsversuche	12
2.6.1 Impfversuche mit heterologem Challenge	13
2.6.2 Art und Überprüfbarkeit der Immunantwort	14
2.6.3 Immunisierung mit Bakterienteilkomponenten	16
3. Eigene Untersuchungen	20
3.1 Material	20
3.1.1 Untersuchte Tiere	20
3.1.2 Salmonellastämme	22
3.1.3 Faktorenseren zur Salmonellendiagnostik	22
3.1.4 Chemikalien und Lösungen	23
3.2 Methoden	27
3.2.1 Herstellung des Rohestraktes	27
3.2.2 Latextest	28
3.2.3 Ultradünnschicht-PAG-Elektrophorese	30
3.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes/Proteinnachweis	30
3.2.5 Aminosäuresequenzanalyse	30
3.2.6 Immunfluoreszenz	31

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
3.2.7 Herstellung und Applikation der Vakzine	32
3.2.8 Herstellung der Keimsuspension für den Belastungstest	32
3.2.9 Klinische, serologische, bakteriologische Untersuchungen	33
3.2.9.1 Prüfung des klinischen Verhaltens	33
3.2.9.2 Seren	33
3.2.9.3 Blutkuchen	33
3.2.9.4 Kot	33
3.2.9.5 Organe	34
3.2.9.6 Kultureller Nachweis von Salmonellen in Kot, Blut und Organen	34
3.2.9.7 Durchführung der Objektträger-Schnell- agglutination (OSA)	34
3.2.9.8 Durchführung der Langsam-Agglutination (LA)	34
3.3 Versuchsanordnung und Durchführung	35
3.3.1 Vorversuch	35
3.3.2 Hauptversuch	35
4. Ergebnisse	38
4.1 Latextest	38
4.2 Biochemische Untersuchungen	40
4.3 Immunfluoreszenz	43
4.4 Vorversuch	46
4.5 Hauptversuch	48
4.5.1 Gruppe I	48
4.5.2 Gruppe II	48
4.5.3 Gruppe III	49
5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	56
7. Alphabetisches Literaturverzeichnis	59
8. Tabellarischer Anhang	73

Kürzelverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	Aminosäuren
BHI	Brain-Heart-Infusion
F-Antigen	Fimbrienantigen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IF	Immunofluoreszenz
i.m.	intra musculär
i.p.	intra peritoneal
LA	Langsamagglutination
LPS	Lipopolysaccharid
MGW	Molekulargewicht
OSA	Objektträgerschnellagglutination
PAG	Polyacrylamidgel
PBS	Phosphate buffered saline
p.Ch.	post Challenge
pH-Wert	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität einer Lösung
pk-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten k von Elektrolyten
s.c.	subcutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S.--	Salmonella --
S.gall.	Salmonella gallinarum
STC	Salmonella typhimurium var. copenhagen
STM	Salmonella typhimurium
TS	Trockensubstanz

1.

Einleitung und Problemstellung

Salmonellose und Salmonella-Infektionen der Tauben stellen für den Tierarzt in Klinik und Praxis ein nach wie vor nur unbefriedigend zu lösendes Problem dar. Eine mögliche Chemotherapie führt selten zur Bestandssanierung, da durch die ubiquitäre Verbreitung des Erregers eine Reinfektion trotz hygienischer Maßnahmen praktisch nie auszuschließen ist. Vertikale Übertragbarkeit sowie zahlreiche Vektoren wie Nagetiere, Insekten, Futterkontamination und Umwelteinflüsse sind hier die limitierenden Faktoren (BÖRGER, 1984).

Nicht so sehr das Zoonoseproblem - die Copenhagen-Variante von Salmonella typhimurium scheint für Menschen nahezu apathogen zu sein (van OYE u. BORGHIJS, 1979) - als die zum Teil erheblichen wirtschaftlichen Verluste und züchterischen Mißerfolge führten in den letzten Jahren zu verstärkten Anstrengungen, die Salmonellose der Taube auch durch Impfprophylaxe einzudämmen.

Die Vakzinierungsversuche an Tauben und Hühnern von KRÄMER (1982) mit gereinigtem Flagellin aus STC führten zu der Überlegung, ob die nach dem Verfahren von FEY und SUTER hergestellten Flagelline als Rohextrakte heterologe Antigenstrukturen enthalten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte vor allem auch festgestellt werden, inwieweit durch saure Hydrolyse aus Salmonellakulturen auch Fimbrienproteine und andere Zellwandbestandteile mit extrahiert werden und ob diese in Tauben oral und parenteral appliziert eine Immunantwort und eine eventuell damit verbundene Schutzfunktion auszulösen imstande sind.

2. Literatur

2.1 Die bakterielle Zellwand

Die Zellwand der gramnegativen Bakterien besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Verbindungen dieser Bausteine.

2.1.1 Die Lipopolysaccharide

Nach der Arbeitsgruppe LÜDERITZ, STAUB und WESTPHAL (1966) besteht der Lipopolysaccharidanteil der Salmonellen aus 3 Regionen

Region I stellt ein Polysaccharid dar, das als Träger der O-spezifischen Antigene anzusehen ist;

Region II wird als Kernoligosaccharid bezeichnet, dem Gerüstaufgaben zuzuordnen sind;

Region III ist das Lipoid A, das als Träger der endotoxischen Eigenschaften fungiert und das bei allen Salm. Spezies gleich aufgebaut ist.

Das Kapsel-Antigen (Vi-Antigen), das sich ganz außen anschließt, wird zwar nach dem Kauffmann-White Schema zu den H-Antigenen gezählt, besteht jedoch aus Mucopolysacchariden. Ihm werden Schutzfunktionen und damit Virulenzeigenschaften zugeschrieben.

2.1.2 Die Proteine

Der Proteinanteil der Zellwand besteht nach SELTMANN (1982) aus 4 Hauptanteilen.

2.1.2.1 Die Geißeln

Der Geißelapparat ist als Fortbewegungsorganelle anzusehen und ist Träger der H-Antigene. Es können eine oder mehrere Geißeln pro Bakterienzelle polar oder peritrich vorkommen. Alseinzige unbegeißelte und damit immer unbewegliche Salm. Spezies ist bisher *S. gallinarum* bekannt (PIETZSCH et al., 1981).

2.1.2.2 Die Fimbrien/Pili

SELTMAN (1982) unterscheidet zwischen Fimbrien mit adhäsiven Eigenschaften und Pili, die zur Plasmidübertragung dienen, wobei nach DUGUID (1969) Fimbrien/Pili (bi)polar auf der Bakterienoberfläche bzw. peritrich bis zonal verteilt sein können.

Fimbrien können nach ALEKSIC¹ et al. (1978) bei allen Enterobacteriaceae vorkommen. ALEKSIC (1979) stellte weiter fest, daß die F-Antigene der Salm. Subgenus I nicht nur untereinander nahe verwandt sondern absolut identisch sind. Er beschreibt das Fimbrien-Antigen als reine Proteinkomponente (LPS-Anteil 0,03 %), zusammengesetzt aus 17 Aminosäuren und als heterogenes Gemisch mit Molekulargewichten zwischen 23.000 und 270.000 Daltons je nach Aggregationszustand.

Demgegenüber beschrieb BRINTON (1959) die relative Widerstandsfähigkeit der Pili im Gegensatz zu der der Flagellen gegenüber verschiedenen Proteindenaturantien und folgert daraus, daß sie nicht nur aus Protein bestehen.

ALEKSIC (1978) berichtet über die geringgradige elektrophoretische Mobilität des Fimbrienproteins und beschreibt seine schlechte Löslichkeit in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen pH-Werten. Der pk-Wert wird mit 3,9 angegeben. Die Fimbrien wurden durch Homogenisieren der gewaschenen Bakteriensuspension gewonnen und neigten zu sofortiger Aggregation zu zusammengeballten Partikeln großmolekularer Struktur.

2.1.2.3 Die Haupt- und Nebenproteine

Diese Proteine werden nicht nach ihrer biologischen Bedeutung so benannt, sondern nach der Häufigkeit ihres Vorkommens. Der Anteil der Hauptproteine dieser Proteinklasse beträgt 70 %, der der Nebenproteine 30 %. Die Haupt- oder Major outer membrane proteins bestehen (nach SELTMANN, 1982) aus folgenden Anteilen

- I Matrixproteine
 Sie erfüllen Gerüstfunktionen, vor allem bei LPS-freien R-Mutanten

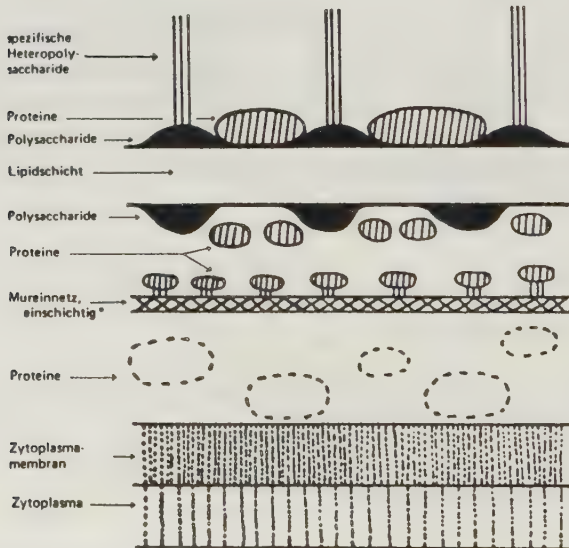
- II Die hitzemodifizierbaren Proteine des Henning'schen Systems
 Sie fungieren als Phagenrezeptoren und spielen eine Rolle beim Plasmidtransfer

- III Proteine, die immer mit LPS verunreinigt und noch nicht genau untersucht sind

- IV Das Braun'sche Lipoprotein
 Es dient der Stabilisierung der Zellwand.

Die Nebenproteine erfüllen Stoffwechselfunktionen und spielen eine Rolle bei der Nährstoffaufnahme. Sie sind noch nicht näher klassifiziert. Die Angaben über die Molekulargewichte der Haupt- und Nebenproteine schwanken zwischen 7.000 und 80.000 Daltons je nach Aggregationszustand und Löslichkeit in verschiedenen Extraktionsmedien.

Die Verteilung der Zellwandbausteine zeigt die nachfolgende Grafik unten. Geißeln und Fimbrien entspringen unterhalb der Zytoplasmamembran.



* bei grampositiven Species stets mehrschichtig

(aus ROLLE, MAYR 1985)

2.2

Der Erreger

Die Salmonella-Infektion der Taube wird überwiegend durch *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* (STC) verursacht. Nach PIETZSCH (1980) sind 98,4 % der Isolate aus Tauben auf diesen Keim zurückzuführen, während neuere Untersuchungen von SCHELLNER (1985), durchgeführt am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen in Südbayern, Oberschleißheim, nur 63,3 % der Taubenisolate auf STC hinweisen.

Der Keim gehört zur Familie der gramnegativen Enterobacteriaceen, Gattung *Salmonella*, und weist nach dem Kaufmann-White Schema die Antigenformel 01,4,-,12;H i; 1,2 auf, wobei sich die Copenhagenvariante durch das Fehlen des 05 Antigens auszeichnet (KAUFFMANN, 1934, LÜTHGEN 1966, WUTHE 1971), während das 01 Antigen als phagenabhängig bezeichnet wird und bei nicht lysogenen Stämmen fehlen kann (Le MINOR, 1984).

2.3

Vorkommen und Verbreitung

Von den verschiedenen *Salmonella*-Serotypen ist nach PIETZSCH (1980) bei Vogelisolaten STM am weitesten anzutreffen. Es konnten jedoch von SCHELLNER (1985) auch *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. gallinarum* und *S. heidelberg* isoliert werden.

Über die Bestandsverseuchung bei Haustauben gibt es unterschiedliche Angaben. Sie schwanken zwischen 7,6 % bei Rei-

setaubenbeständen und 18,9% bei Rassetauben (nach BUSCHE, 1980). Auch der Verseuchungsgrad der Stadtauben schwankt zwischen ca. 3 % in München (GRIMM, 1985) und 30 % Isolierungen aus Taubenkot in Venedig (MÜLLER, 1970).

2.4 Pathogenese

Die Salmonella-Infektion der Taube kann nach KÖSTERS (1980) in unterschiedlichen Formen auftreten

- a) Die passagere Infektion
die Erreger werden durch den Magen-Darm-Trakt geschleust, ohne daß es zur Keimansiedelung kommt.
- b) Die inapparente Infektion
hier kommt es zur Keimvermehrung und Organbesiedelung, ohne daß jedoch klinische Erscheinungen zu Tage treten.
- c) Die klinische Verlaufsform
hierbei kann es akut oder chronisch zu septikämischen, enteritischen und encephalitischen Erscheinungen oder zu Gelenksentzündungen kommen. Auch Todesfälle können auftreten (VOGEL, 1983).

Der Verlauf der Infektion hängt von der Prädisposition des Wirts und von erregerspezifischen Faktoren ab (aufgenommene Keimzahl, Infektionspforte, Virulenz).

RUITENBERG et al. (1971) berichten, daß sie mit 5×10^2 STM-Keimen, i.p. verabreicht, bei Mäusen keine klinische Infektion erreichen konnten. Angaben über orale Infektionsdosen, die zur Infektion führen, schwanken zwischen 10^2 und 10^4 bei Mäusen (SCHLECHT, 1984) und 3×10^6 (HÖRTER, 1971) und 3×10^8 (KRÄMER, 1983) bei Tauben.

TANAKA et al. (1978, 1981, 1982) zeigten mit ihren Versuchen, daß die Virulenz fimbrierter Stämme (Adhäsionseigenschaften, Vermehrungsrate) weit über der fimbrienloser Stämme liegt. Sie konnten in gewaschener Darmmukosa vorher infizierter Mäuse an den Microvilli nur noch fimbrierte Keime nachweisen.

Der Verlust von O-Antigenen geht nach MÄKELÄ et al. (1973) zumeist mit Virulenzminderung einher und umgekehrt.

Nach SCHLECHT et al. (1979, 1984) korreliert auch das Fettsäuremuster der Phospholipide mit der Virulenz (Lipid A).

Nach BULLING und HELMUTH (1986) sind Kolonisation, Penetration und Invasion einiger weit verbreiteter S.-Spezies mit virulenz-assoziierten Plasmiden in Zusammenhang zu bringen.

2.5 Immunitätsmechanismen

2.5.1 Unspezifische Resistenz

Hierzu zählen nicht genau determinierte genetische und konstitutionelle Faktoren, die unter dem Begriff natürliche Resistenz zusammengefaßt werden, wie z.B. Spezies, Alter, Ernährungszustand, Streßfaktoren, Haltung, Hygiene etc.

Ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Resistenz ist die lokale Erregerabwehr der Haut und Schleimhäute. Im Falle der Enterobacteriaceae ist bei der gewöhnlich oral erfolgenden Keimaufnahme das saure Milieu des vorderen Verdauungstraktes mit einem pH-Wert von 3-4 bei Tauben (KRÄMER, 1983) als erstes Hindernis anzusehen. Sofern die aufgenommenen Keime über keinen speziellen Säureschutz verfügen, wie z.B. Mykobakterien, bedarf es relativ hoher Keimzahlen, um dieses Hindernis zu überwinden. Bei humaner Salmonelleninfektion sind mindestens 10^6 Keime notwendig (WHO, 1972). Nur etwa 1 % der aufgenommenen Keimzahlen überlebt diese niedrigen pH-Werte (COLLINS, 1972).

Ein anderer Bestandteil des unspezifischen Abwehrsystems ist die physiologisch vorhandene Eigenflora des gesunden Tieres. Diese Keime treten in Konkurrenz zu den aufgenommenen pathogenen Arten um Anheftungsstellen und Stoffwechselprodukte (ROWLEY, 1977).

Als eine nicht zu unterschätzende Abwehrmöglichkeit des Organismus gegen pathogene Darmkeime ist auch die Darmperistaltik anzusehen, die nicht zum Haften kommende Erreger relativ schnell zum unempfindlicheren Dickdarm transportiert (ROWLEY, 1977).

Einen weiteren unspezifischen Abwehrmechanismus stellen die im Darm befindlichen antibakteriellen Substanzen dar, wie Lysozym, Laktoferrin, β_2 -Glykoprotein sowie die Mikro- und Makrophagen (BELLAMY und NIELSEN, 1974).

2.5.2 Spezifische Resistenzmechanismen

2.5.2.1 Humorale Faktoren

Wie bereits von mehreren Autoren übereinstimmend beschrieben, stehen die humoralen Serumantikörper, zumeist durch parenterale Vakzinierung mit Totantigen induziert, in keinem direkten Zusammenhang mit einer Schutzfunktion bei oraler Salmonelleninfektion (HORNICK 1970, RAETTIG 1971, KRÄMER 1983).

2.5.2.2 Zellulär vermittelte Resistenz

Größere Bedeutung im Abwehrgeschehen bei Salmonella-Infektionen kommt der zellulären Komponente zu. Hierzu zählen in erster Linie Lymphozyten des B- und T-Zell-Systems sowie die durch Lymphokine aktivierten Makrophagen (DUMONDE et al., 1969). Die Rolle der T-Lymphozyten ist bei lokalen Immunmechanismen im Darm noch umstritten.

Größere Bedeutung kommt speziell beim Vogel den Bursa fabricii vermittelten B-Lymphocyten zu, die in erster Linie IgA ins Darmlumen sezernieren. ROWLEY (1974) hält es für möglich, daß die eigentliche Funktion dieser Antikörperklasse in der Verhinderung des Anheftens der Erreger an die Darmschleimhaut zu sehen ist.

2.5.3 Die Schleimhaut-vermittelte Immunität

Die Immunität der Schleimhäute unterliegt nach BIENENSTOCK et al. (1980) vier Prinzipien:

- a) Die Schleimhautimmunität wird unabhängig vom Immunitätszustand im Serum ausgebildet. Der Antikörper-Titer im Serum ist kein Maß für den Immunitätsstatus.
- b) Die Schleimhautimmunität kann nur durch einmalige Applikation von lebendem Antigen oder durch wiederholte Gabe von inaktiviertem Antigen induziert werden. RAETTIG (1971) zeigte, daß die orale Immunisierung von Mäusen erfolgreicher war, wenn der inaktivierte Impfstoff über 20 Tage in kleineren Portionen verabreicht wurde, statt einer einmaligen hohen Antigengabe.
- c) Aufgrund des ersten und zweiten Prinzips ist die orale Impfmethode zur Induzierung einer Schleimhautimmunität der parenteralen Antigenverabreichung überlegen.
- d) Die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses in Schleimhäuten ist gering und erreicht ihr Maximum 3 Wochen nach Beginn der Immunisierung (ALLEN und PORTER, 1975).

2.6

Immunisierungsversuche

Die Veröffentlichungen über Vakzinierungsversuche gegen Salmonellose an verschiedenen Tierarten mit unterschiedlichen Impfstoffaufbereitungen sind so zahlreich, daß ihre Darstellung den Rahmen einer Dissertation sprengen würde. So sollen hier im Folgenden nur die Stellen zitiert werden, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit dienen. Dies sind in erster Linie, aber nicht nur, Arbeiten, die sich mit heterologem Impfschutz und mit Fraktionsimpfstoffen befassen.

2.6.1 Impfversuche mit heterologem Challenge

Der Gedanke eines Common-Antigens bei der Salmonellosebekämpfung vor allem hinsichtlich der Verwendbarkeit in der Humanmedizin ist nicht neu.

SCHLECHT (1980) stellt im Mäuseinfektionsversuch nach vorheriger Impfung mit Extrakten aus R-Mutanten fest, daß die im Extrakt enthaltenen Lipopolysaccharid-, Phospholipid- und Nukleinsäureanteile nicht die wirksamen Antigene darstellen. Er postuliert ubiquitäre Proteine als heterolog antiinfektiös wirksame Immunogene.

BHATNAGARS et al. (1982) Versuche, die Proteinkomponente des sog. "Barber-Antigens" zu reinigen, bewiesen ebenfalls die Anwesenheit von dagegen gerichteten Antikörpern im Patientenblut und in der Darmschleimhaut (TSANG et al., 1983).

SCHLECHT (1980) folgert aus seinen Versuchen mit R-Mutanten, die einen spezieübergreifenden Schutz gegen S-Form Infektionen zu erzeugen im Stande waren, daß die Salmonellenoberfläche noch andere als die bekannten Immunogene aufweist, und daß diese für den heterologen Infektionsschutz von Bedeutung sind.

Nach BARBER u. EYLAN (1975) erzeugte eine Immunisierung von Mäusen mit einem Proteinextrakt aus *S. cholerae*-suis heterologen Impfschutz gegen eine experimentelle Infektion ($4,5 \times 10^6$ - $4,5 \times 10^8$) mit *S. typhimurium* u. *S. paratyphi* B/C u. umgekehrt. Sie führten dieses Phänomen auf eine Verwandtschaft der Stämme über gemeinsame Proteine zurück, deren Art und Anteil gemeinsamer Schutzdeterminanten noch zu bestimmen seien.

In weiteren Versuchen (1976) stellte er fest, daß eine Impfung von 10 Tage alten Kücken mit avirulentem *S. gallinarum* sowohl gegen den Impfstamm als auch gegen *S. enteritidis* Antiprotein-Antikörper induziert.

RHODE (1958) beschreibt gewisse antigene Beziehungen zwischen verschiedenen *Salmonella* H-Antigenen, untersucht an *S. kentucky*, *S. rubislaw*, *S. typhimurium*, *S. virchow* und *S. aberdeen* mit zum Teil sehr hohen heterologen Serumagglutinationstitern, die er auf gemeinsame Teilfaktoren zurückführt.

2.6.2 Art und Überprüfbarkeit der Immunantwort

Über die Qualität eines Impfschutzes gibt es die unterschiedlichsten Angaben.

SZIEGOLEIT (1976) identifiziert die Antikörperentwicklung bei oraler Mäuseinfektion mit STM sowohl zellulär-sekretorisch als auch humoral folgendermaßen:

Zelluläre Antikörper (Darm, Mukosa) ab dem 7. Tag p.i. als IgA, ab dem 21. Tag als IgG; die Serumantikörper ab dem 12. Tag als IgG und IgM, nach dem 21. Tag nur noch als IgG. Es wird diskutiert, daß eine Behinderung des Eintritts in die Darmwand durch zelluläre Antikörper den Salmonellen ihre pathogenen Eigenschaften nehmen könnte.

SCHULTZE (1973) berichtet über einen signifikanten Anstieg der Phagozytoserate gegenüber inaktivierten Streptokokken nach vorheriger 10-maliger oraler STM-Antigengabe,

wobei diese unspezifische Phagozytoserate langsamer ansteigt und schneller abfällt als der Infektionsschutz nach spezifischer Belastung.

Ähnliches beschreibt RAETTIG (1973), der Mäuse an 10 aufeinanderfolgenden Tagen mit inaktivierten Colibakterien oral immunisiert hat und eine maximale Schutzwirkung am 10. Tag der Impfung konstatierte, wobei die Phagozytoserate sowie die Zahl der IgA-bildenden Immunozyten ähnlich anstiegen wie die Kurve des Impfschutzes.

MARGNI et al. (1983) zeigten, daß nicht agglutinierende Seruman-tikörper vom Typ IgG (STM, Kaninchen) während der ganzen Immunisierungsperiode im Serum nachzuweisen waren. Sie hatten einen höheren Spiegel als solche vom agglutinierenden Typ (ebenfalls IgG), erwiesen sich aber im Schutzversuch (Serumtherapie) als weniger effektiv als diese.

ROBERTSON et al. (1982) beschreiben die T-Zell-abhängige Immunantwort bei Salmonelleninfektionen bei Kälbern als zweigleisig zum einen gegen die LPS-Komponente, zum anderen gegen den Außenmembranproteinkomplex gerichtet.

SILVA et al. (1981) erzieltendurch parenterale Immunisierung von Hühnern mit R-Mutanten von *S. gallinarum* keine protektive Wirkung gegenüber Infektionen mit heterologen Stämmen (STM und *S. infantis*). Die Schutzwirkung gegenüber der homologen Infektion mit S-Form *S. gallinarum* beschrieben sie als unabhängig vom humoralen Antikörperspiegel und bezeichneten sie als rein zellgebundene Immunität.

DEVRIESE u. DEVOS (1982) führten Versuche mit einem inaktivierten STC-Öl-Adjuvans-Impfstoff an Tauben durch und zeigten, daß eine einmalige Injektion und Challenge 6 Monate später die Ausscheidungsrate der Salmonellen im Kot der geimpften Tiere gegenüber der Kontrollgruppe lediglich erniedrigt. Im Laufe ihrer Versuche stellten sie fest, daß gut gehaltene und wohl ernährte gesunde Tauben (ungeimpft) spontan von der Salmonellose genesen, während mit den Faeces auch weiter Salmonellen ausgeschieden werden. Ähnliche Ergebnisse erzielte KRÄMER (1983) mit der parenteralen Injektion von STC-Flaggelin.

Während in den meisten aufgeführten Arbeiten das Mausmodell und die Letalität (LD 50) als Maßstab für den Impferfolg diente, sind für die Problematik der Taubensalmonellose andere Kriterien zugrunde zu legen. Während HÖRTER (1971) die Erniedrigung der Ausscheidungsrate geimpfter Tiere als zufriedenstellend erachtete, schließen wir uns der Auffassung von RÜGER und RADDEI (1981) an, die von einer erfolgreichen Impfung u.a. ein Sistieren der Ausscheidung nach dem 5. Tag p. Ch. fordern.

2.6.3 Immunisierung mit Bakterienteilkomponenten

Einige Grundsätze, die von den meisten Autoren, die mit Spaltvakzinen arbeiten, befolgt werden, beziehen sich u.a. auf die weitgehende Erhaltung der Molekülstrukturen der Spaltprodukte.

Hauptfaktoren des Schutzes vor einer Reinfektion sind Parameter der zellulären Immunität (COLLINS, 1974).

Zwischen den durch hitzeinaktivierten Antigenen ausgelösten

humoralen Antikörpertitern und der Immunität gegen eine Infektion bestehen offensichtlich keine direkten Beziehungen (HORNICK, 1970). Impfstoffe aus inaktivierten Salmonellen führen bei letaler Infektionsbelastung lediglich zu verlängerter Überlebenszeit (MITSUHASHI et al., 1958). Impfstoffe, bei denen der Proteinanteil der Bakterienzelle erhalten bleibt, aktivieren in Abhängigkeit von ihrer Gewebepersistenz die zelluläre Immunität (Monocytenaktivität) und schützen vor letaler Infektionsbelastung (MITSUHASHI, 1961; COLLINS, 1974).

KORDES et al. (1971) untersuchten die Wirksamkeit von STM-oral Impfstoffen, die mit verschiedenen physikalischen und chemischen Verfahren inaktiviert wurden und stellten fest, daß wirkungslose Impfstoffe dann entstehen, wenn die makromolekulare Grundstruktur der Proteinanteile zu stark denaturiert wird.

CHANDRAN et al. (1983) Versuche mit lebenden und inaktivierten Vakzinen aus *S. enteritidis* und *S. gallinarum* an Hühnern zeigten, daß die zelluläre Immunantwort der Darmmukosa-Makrophagen bei hitzeinaktivierten (d.h. Proteinstrukturen weitgehend zerstört) Impfstämmen deutlich reduziert ist gegenüber der Lebendvakzine.

Sowohl über die Art der Extraktionsmedien als auch über Art und Umfang der Schutzwirkung gibt es verschiedene Berichte.

RIBI et al. (1959) haben festgestellt, daß nach s.c. Immunisierung im Mäuseschutzversuch Zellwandpräparationen

von *S. enteritidis* 7-fach besser wirken als entsprechende Vollantigene. Demgegenüber kamen BIRNSCHEIN et al. (1972) zu dem Ergebnis, daß chemisch oder physikalisch gewonnene Fraktionsimpfstoffe schlechter immunogen waren als das hitzeinaktivierte Vollantigen; während OCKLITZ et al. (1967) mit einem Desoxycholatextrakt aus Colibakterien einen ebenso großen Schutzwert im Tierversuch erzielten wie mit dem Vollantigen, wobei der Impfstoff als "elektro-nenoptisch leer" bezeichnet wurde.

Ebenso bewies SCHLECHT (1984), daß der Schutz durch gereinigte *Salmonella*-Proteine geringer ist als der der komplex zusammengesetzten Rohextrakte.

Nach MÜLLER et al. (1985) vermittelt die dreimalige Injektion eines zell- und LPS-freien Kulturfiltrates (Colibiogen^R) aus *Escherichia coli* an Mäuse einen signifikanten Schutz gegenüber einer Placebogruppe nach einer Infektion mit 100 LD 50.

PLANTS parenterale Immunisierungsversuche (1982) mit einem Protein-LPS-Komplex, extrahiert mit Trichloressigsäure aus STM, schützten 37 % der mit 100 LD 50 infizierten Mäuse.

KIRCHNER u. HELLMANN (1982) provozierten mit fünfmaliger oraler Verabreichung von hitzeinaktivierten STM und einer Boosterung nach 12 Tagen (5 x oral oder 1 x i.v.) zwar IgA-produzierende Zellen in der Darmmukosa und IgG-Zellen in der Milz, erzielten aber nur unbedeutende Schutzwirkung nach homologem Challenge. Deutlich bessere Ergebnisse brachte eine orale Verabreichung von lebenden K 88 *E.coli* vor dem Challenge mit STM.

PADMANABAN u. MITTAL (1979) erzielten mit zellfreien Spaltvakzinen keine Immunität gegen STM, *S. enteritidis* (Mäuse) und *S. gallinarum* (Hühner).

BARBER u. EYLAN (1980) stellten ein rohes Protein-Antigen, das sogenannte "Barber-Antigen", aus *S. typhi* durch Extraktion mit Veronalpuffer und Trichloressigsäurefällung her. Serologische Untersuchungen zeigten, daß auf diese Weise ein sehr heterogenes Gemisch entsteht, das Proteine, LPS-Anteile und Vi-Antigene enthält. Es wurden in Seren von Typhuspatienten spezifische Antikörper gegen die Proteine des "Barber-Antigens" gefunden (TSANG et al., 1983).

Der aus 5 verschiedenen S- und R-Stämmen von SCHLECHT (1981) aus STM und *S. minnesota* durch Harnstoffextraktion gewonnene Rohextrakt enthält hauptsächlich Protein, jedoch auch LPS, Phospholipide und Aminosäuren. Im Mäuseinfektionsversuch wurde nach vorheriger 2-maliger i.p. Impfung eine signifikante heterologe Schutzwirkung beobachtet. Die anhand von chemischen Analysendaten und Polypeptidmustern dargestellten Unterschiede in der Zusammensetzung der Extrakte geben jedoch keine hinreichende Erklärung für deren immunologische Wirksamkeit.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Untersuchte Tiere

Haustauben (Columba livia, Gmel. 1789 var.dom.)

Zur Verfügung standen 54 Tiere verschiedener Rassen, Alter 12 - 15 Monate, beiderlei Geschlechts aus dem Taubenbestand des Instituts.

Unterbringung

Es wurden jeweils 2 Tiere in Käfigen mit Drahtboden untergebracht. Die Käfige standen einzeln auf Regalen in einem festen Stallraum mit natürlichem Tageslicht. Die Stalltemperatur betrug etwa 18 Grad.

Fütterung

Standardruhefutter der Firma Geb. De Schœemaeker, Belgien sowie Taubengrit und Leitungswasser zur freien Aufnahme.

Gesundheitskontrolle

Neben einer gründlichen klinischen Untersuchung wurden vor Versuchsbeginn alle Tiere speziell auf nachfolgende Erreger untersucht:

Ekto- und Endoparasiten	klinisch, Kropfabstrich, Kot: Sediment, Flotation	2 x wöchentlich über 3 Wochen
Ausscheidung v. Salmonellen	Einzelkloakentuper: An- reicherung b. 37 u.43°C	3 x wöchentlich über 3 Wochen
Ausscheidung v. Viren	Kot: Eikultur (9 Tage embryonierte Hühnereier, Allantoisbeimpfung, 2 Passagen)	2 x im Abstand von 14 Tagen
Antikörper gg. Salmonellen	Serum: Objektträgeraggl. Langsamagglutination	1 x wöchentlich über 3 Wochen
Antikörper gg. Virus- infektio- nen	Serum: Hämaggl.-Hem- mungstest (Paramyxoviren) Agargel-Präzipitations- test (Taubenherpes, Tau- benpocken, Newcastle Di- sease).	1 x wöchentlich über 3 Wochen

Sämtliche Tiere waren frei von Ekto- und Endoparasiten. Sie wiesen keine Antikörper gegen die untersuchten Erreger auf und schieden über den Untersuchungszeitraum keine Erreger aus.

3.1.2 Salmonellenstämme

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Salmonella-
stämme benötigt und verwendet:

1. S. typhimurium var.cop. 4916/85	0 1,4,-,12	H i;	1,2	
2. S. heidelberg 3941/83	0 1,4,12	H r;	1,2	
3. S. enteritidis	0 1,9,12	H gm;	1,7	
4. S. dublin	0 1,9,12	H gp;		Vi
5. S. gallinarum 184/64	0 1,9,12	H -;	-	
6. S. straßbourg RKI	0 1,9,46	H d;	1,7	
7. S. reading 7036/77	0 1,4,5,12	H e,h;	1,5	
8. S. senftenberg 1305	0 1,3,19	H g,s,t;		
9. S. typhi T2 H bg	0 1,9,12 _{2,3}	H d;		Vi
10. S. typhi T4 H bg	0 1,9,12 _{1,3}	H d;		Vi

Die Stämme 1 und 2 sind institutseigene Isolate aus Sektions-
material. Die Stämme 3 und 4 wurden freundlicherweise von der
bakteriologischen Abteilung des Tiergesundheitsdienstes (TGD)
Grub zur Verfügung gestellt.

Die Stämme 5 - 10 wurden dankeswerterweise von der Salmonellen-
Zentrale des Bundesgesundheitsamtes in Berlin übersandt.

3.1.3 Faktorensereen zur Salmonellendiagnostik

Verwendet wurden die Salmonella-Testseren

Anti- 01, 04, 05, 09, 012, 0V1

Anti-H a-b-c-d-eh-enx-f-gm-gp-i-k-lv-m-p-q-r-s-t-v

w-y-z-z₆-z₁₀-z₁₃-z₁₅-z₂₈-z₂₉-1,2-2-5-6-7

Die Antiseren 01 und 012 wurden selbst hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen und Absättigung der gewonnenen Seren mit den entsprechenden Antigenen (nach RAMIREZ, 1976). Bei den übrigen Testseren handelte es sich um käufliche Standards der Firma Behring, Marburg.

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Latextest

Tiefgefrorene Lösungen von polymerem Flagellin, hergestellt aus verschiedenen STC-Isolaten, gelchromatographisch gereinigt und ungereinigt aus dem Institutsfundus.

Zur Herstellung der Rohextrakte

0,05 molare Salzsäure

2,0 molare Salzsäure

hergestellt aus Salzsäure Titrisol (Merck¹ Nr. 9971)

2,0 molare Natronlauge

hergestellt aus Natriumhydroxid-Plättchen z.A. (Merck Nr. 6498)

Ammoniumsulfat z.A.

(Merck Nr. 1217)

Eosin gelblich

(Merck Nr. 1345)

Bacto-Latex 0,81

(Difco Nr. 3102-57)

PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,2:

Natriumchlorid	8,0 g	Merck	6404
Kaliumchlorid	0,2 g	Serva	36868
Dinatriumhydrogenphosphat	1,44 g	Serva	6586
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g	Merck	26870
Aqua dest.	ad 1000 ml		

Biochemische Untersuchungen

Ultradünnschicht Gelelektrophorese/Fokussierung:

Acrylamid	LKB 1820-101
NN-Methylen bis Acrylamid	LKB 1820-102
Ammoniumpersulfat	LKB 1820-103
Tetramethylethylendiamin	LKB 1820-104
Ampholine pH 3-10	LKB 1818-101
Repel Silane	LKB 1850-250
Asparaginsäure	Serva 14140
Arginin	Serva 13909
Glutaminsäure	Serva 22980
Lysin	Serva 28155
Äthylendiamin	Serva 11270
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	LKB 1830-101
1,0 molare Phosphorsäure	Merck 573
Imidazole	Serva 26081
2-Mercaptoethanol	LKB 1830-401
Triton X-100	LKB 1830-201

Färbungen:

Coomassie Blue, R-250	LKB 1840-101
Silbernitrat	Sigma S 6506
Methanol	Merck 6009
Äthanol	BSB Spiritus
Essigsäure	Merck 63
Glyzerin	Serva 23175
Trichloressigsäure	Serva 36910
Sulfosalicylsäure	Serva 35706
Formaldehyd	Merck 4001
Natriumcarbonat	Merck 6392
Kalium Hexacyanoferrat	Merck 59213

Proteinnachweis:

Biuret-Reagenz Conc.	Sigma 900-26-10
Rinderserumalbumin	Serva 11930

Immunfluoreszenz:

Antikörperlösung (aus imm. Tauben)	
Fluoresceinisothiocyanat (FITC),	
Isomer 1	Sigma F 7250
Natriumhydrogenphosphat	Merck 6586
Natriumhydrogencarbonat	Merck 6329
Natriumcarbonat	Merck 6392
Carbonat/Bicarbonat-Puffer, pH 9,5	
Natriumphosphat	Sigma S 1001
Sephadex G25 Fertigsäulen	Pharmacia 17-0851-01

Bakterielle Diagnostik

Nährlösungen, Nährböden:

Brain-Heart-Infusion		Difco Nr. 0037-01-6
Müller-Kauffmann-Tetra- thionat-Bouillon		Oxoid Nr. CEM 343
Brillantgrün-Phenolrot- Laktose-Agar		Oxoid Nr. CEM 329
Bacto-Agar		Difco Nr. 0140-01
Blutagar, bestehend aus		
Blood Agar Base	40 g	Difco Nr. 0045-01-6
Bacto Agar	6 g	Difco Nr. 0140-01
geschütteltes Rinder- blut	100 g	
ad 1000 ml Aqua bidest		
Sabouraud-Dextrose-Agar		Difco Nr. 0109-01
Thiomersal		Serva 11375

3.2

Methoden

3.2.1

Herstellung des Rohextraktes

In Anlehnung an das Verfahren zur Herstellung von polymerem Flagellin nach FEY und SUTER (1979) wurde eine Kolonie des Stammes *S. gallinarum* 184/64 zur Voranreicherung in 10 ml BHI-Lösung bei 42°C 18 Stunden inkubiert. Um logarithmisches Wachstum zu erreichen, wurden von dieser Suspension 10, 100, 1000 µl in 10, 100, 1000 ml BHI-Lösung verbracht und jeweils bei 42°C für 18 Std. inkubiert. Die so erhaltene Suspension von 1 l mit einer Dichte von ca. 3×10^{10} Keimen/ml, gemessen mit der Trübungsreihe nach MC Farland, wurde mit 2 n Salzsäure auf einen pH von 1,5 eingestellt und über Nacht auf Magnetrührer bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Danach folgte eine Zentrifugation bei 49.000 x g. Der Überstand wurde durch ein Millipore-Filter 0,45 µm membranfiltriert und mit 2 n Natronlauge neutralisiert. Durch Zugabe von 2,66 m Ammoniumsulfat entstand über Nacht unter Rühren bei 4°C ein Präzipitat. Nach erneutem Zentrifugieren bei 20.000 x g wurde das Sediment in Aqua bidest aufgenommen und 3 x 12 Std. gegen Aqua bidest dialysiert.

Nach Zugabe von Thiomersal im Verhältnis 1:10.000 zur Konservierung und nach Sterilitätsüberprüfung wurde die, den Rohextrakt enthaltende Lösung lyophilisiert und in Portionen zu 10 mg Trockensubstanz bei -20°C aufbewahrt.

Die Ausbeute betrug etwa 600 mg TS pro Liter Keimsuspension der o.g. Dichte.

3.2.2

Latextest

Der Latextest ist ein Objektträgertest, mit dem in der Humanmedizin spezifische Rheuma-Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden (Difco-Handbuch S. 740-43). Der beschriebene Test erwies sich für unsere Zwecke, wie angegeben, als ungeeignet. Es mußte eine Methode gefunden werden, den Antigen-Antikörper-Komplex (Flagellin bzw. Rohextrakt x Antiserum) nachzuweisen. Es wurde im Folgenden versucht, eine geeignete Modifikation zu entwickeln, um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können. Folgende Parameter wurden in Vorversuchen variiert:

- a) Konzentration bzw. Verdünnung der Bacto Latex Suspension mit verschiedenen Medien hinsichtlich Haltbarkeit und Autoagglutination (Aqua dest, Aqua pro inj., PBS, phys. NaCl, pur)
- b) Reaktionszeit OSA (direkt, 3 Min., 10 Min.)
- c) Reaktionszeit bei Inkubation
(1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h)
- d) Zugabe bzw. Weglassen einer 1%-igen Eosinlösung als Pseudoagglutinationshemmer
- e) Inkubationstemperatur (20°C, 37°C, 40°C)
- f) Antigenkonzentration pro Reaktionseinheit
(10 µl): 1 µg, 4 µg, 40 µg, 100 µg, 400 µg

Konstant: Antiserumzugabe: je 10 µl Behring Standard Anti-H Faktorensereen. Zum Vergleich wurde jeweils eine 3-fach Negativkontrolle mit Rinderserumalbumin-Lösung statt Antigen mitgeführt. Am Ende stellte sich folgende Versuchsdurchführung als Methode der Wahl heraus:

In jeweils drei Reaktionsgefäße pro Faktorensereum einer Dynatech-Mikrotiterplatte mit u-förmigem Querschnitt wurden pipettiert:

10 µl Flagellin/Extrakt-Lösung
+ 10 µl Antiserum (a - z 29, 1-7)
+ 10 µl Eosinlösung (1%-ig)

- rühren -

+ 10 µl Latexsuspension (Verdünnung 1:20 Aqua dest)

- rühren -

Inkubation für 18 h bei 40°C

Im positiven Fall (Reaktion zwischen pFlg und Anti-H Faktorensereum) zeigte sich eine gleichmäßige Beschichtung des Reaktionsgefäßes mit dem Agglutinat; im negativen Fall setzten sich die Latexpartikel als kleines Pünktchen am tiefsten Punkt des konkaven Gefäßbodens ab.

3.2.3

Ultradünnschicht - PAG - Elektrophorese

Mit dem Elektrophorese-Fokussiergerätesatz "Multiphor I" der Firma LKB-Bromma (Schweden), bestehend aus Elektrophoresekammer, Kühlgerät und Stromversorger wurden verschiedene Elektrophoreseläufe bzw. Elektrofokussierungen durchgeführt. Die Gele wurden nach verschiedenen Rezepten nach Herstellervorschrift gegossen (LKB Application Notes 250, 306, 319, SD 221701). Als Vergleich dienten verschiedene Testproteine MGW 10.000 D - 1.000.000 D, pk-Werte von 4 bis 9. Die Konzentration der aufgetragenen Proben lag bei jeweils 1 mg/ml. Gefärbt wurden die Gele mit Comassie-Blue bzw. mit der sehr empfindlichen Silberfärbung nach Heukeshoven (RE-O34).

3.2.4

Bestimmung des Proteingehaltes/Proteinnachweis

Die Proteinbestimmung der Rohextrakte erfolgte kolorimetrisch entweder mit der Biuretmethode (Merck, Klin. Labor S. 138-41) oder direkt photometrisch bei 280 nm mit dem Spektralphotometer SP 6-550 UV/VIS, Firma Pye Unicam. Als Standard diente bovines Serumalbumin.

3.2.5

Aminosäuresequenzanalyse

Die qualitative Untersuchung des Rohextraktes wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Die Analyse erfolgte, nach vorheriger Dünnschicht-

Cellulose-Elektrophorese zu Reinigungszwecken, durch Ionenaustauscherharze auf Basis der Ninhydrinreaktion (Edman-Abbau).

3.3.6

Immunfluoreszenz

Als Ausgangsmaterial wurde das Serum einer mit *S. gallinarum*-Rohextrakt parenteral vakzinierter Taube verwendet.

Die Globulinfällung erfolgte durch Ammoniumsulfatpräzipitation, die Berechnung des Gesamtproteingehaltes der AK-Lösung durch die Biuret-Methode. Die Markierung der Antikörper wurde mit FITC bei Zimmertemperatur und einem pH von 9,5 für 60 Min. unter Rühren vorgenommen. Arbeitsvorschrift nach MAYR et al. (1977).

Die Reinigung des Konjugates (Abtrennung des nichtgebundenen FITC) erfolgte durch Sephadex-Gelfiltration mit G25 Fertigsäulen unter Zugabe von PBS-Puffer. Zur Färbung der Antigene wurde die direkte Technik gewählt:

Saubere, entfettete Objektträger wurden mit *S. gallinarum* bzw. STC-Antigen beschichtet, indem eine Öse entsprechender Bakterienmasse in 100 µl PBS verrührt und vom Rande her ausgestrichen wurde (Technik: Blutausstrich). Nach Lufttrocknung wurden die mit Konjugat beschichteten Präparate für 30 Min. bei 37°C in einer Feuchtekammer gefärbt. Die Negativkontrolle erfolgte durch vorherige Beschichtung der Antigene mit unmarkierten AK vor der Färbung mit Konjugat.

Die Auswertung wurde an einem Leitz-Auflicht-Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Die fotografische Dokumentation erfolgte bei 1200-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 15 Min./Aufnahme.

3.2.7

Herstellung und Applikation der Vakzine

Parenteral:

Die lyophilisierten Portionen des Rohextraktes zu je 10 mg Trockensubstanz wurden nach Bedarf mit je 5 ml (1 Ampulle) Aqua pro injectione aufgelöst. Die dem Immunisierungsschema entsprechende Menge wurde den Tieren i.m. in den Musculus pectoralis profundus oder s.c. unter die Haut der medianen Nackenregion injiziert.

Oral:

Die Trockensubstanz wurde mit je 5 ml Aqua bidest, pH 4.0, aufgelöst und den Tieren jeweils 2 ml (entsprechend 4 mg Trockensubstanz) täglich mit einer Pipette per Kropfinstillation eingegeben.

3.2.8

Herstellung der Keimsuspension für den Belastungstest

Nach einer Tierpassage zur Steigerung der Pathogenität wurde aus dem bakteriologisch gereinigten Kotisolat je eine Kolonie des STC-Stammes 4916/85 in 10 ml steriler BHI-Lösung für 24 h bei 42° C angereichert. Die Bestimmung der Keimzahl dichte erfolgte durch die Trübungsreihe nach MC Farland photometrisch bei 530 nm. Anschließend wurde die Suspension durch Titration auf die benötigten Dichten von 1×10^8 , 3×10^8 und 2×10^9 lebenden Keimen/ml eingestellt. Den Tieren wurde von der entsprechenden Suspension jeweils 1 ml per Kropfinstillation verabreicht.

3.2.9 Klinische, serologische, bakteriologische Untersuchungen

3.2.9.1 Prüfung des klinischen Verhaltens

Das Verhalten der Tiere wurde täglich beobachtet. Als Kriterien wurden Aufmerksamkeit, Belastung der Ständer, Zustand des Gefieders, Kotbeschaffenheit, Futter- und Wasseraufnahme bewertet.

3.2.9.2 Seren

Den Tieren wurde an den später bezeichneten Tagen des Versuchs jeweils 1 ml Blut aus der Vena subcutanea ulnaris steril entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte durch Zentrifugation bei 1000 x g, 5 Min.

3.2.9.3 Blutkuchen

Der bei der Serumgewinnung anfallende Blutkuchen wurde unter sterilen Bedingungen zum kulturellen Nachweis von Salmonellen entnommen und in BHI-Lösung angereichert.

3.2.9.4 Kot

Der Kot wurde an den vorgesehenen Tagen mit sterilen, angefeuchteten (phys. NaCl) Einmalkloakentupfern von jedem Tier einzeln entnommen und in der Anreicherungsflüssigkeit am gleichen Tag bebrütet.

3.2.9.5 Organe

Nach Betäubung und Tötung der Tiere am Versuchsende (42. Tag) wurden folgende Organe unter sterilen Bedingungen entnommen und kulturell auf Salmonellen untersucht: Herz, Leber, Niere, Darm.

3.2.9.6 Kultureller Nachweis von Salmonellen in Kot, Blut und Organen

Die entnommenen Kloakentupfer, Blut- und Organproben wurden in Tetrathionatbouillon bzw. BHI-Lösung bei 42° C angereichert und nach 24 und 48 Stunden mit einer Öse auf eine Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar-Platte überimpft.

3.2.9.7 Durchführung der Objektträger-Schnellagglutination (OSA)

Eine Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar-Platte wurde mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes beimpft und für 18 Stunden bei 42° C bebrütet. Jeweils eine Kolonie dieser Kultur wurde danach auf einem entfetteten Objektträger vom Rand her unter kreisenden Bewegungen in 50 µl des zu testenden Serums verrieben. Das Ergebnis wurde 2 Min. später über einer schwarzen Unterlage abgelesen. Als Kontrollen dienten Faktorensereen für die Objektträger-Agglutination sowie physiologische NaCl-Lösung.

3.2.9.8 Durchführung der Langsam-Agglutination (LA)

In Anlehnung an den modifizierten Latextest wurde für die

LA dieselbe Technik gewählt. Statt Standardfaktorenseren wurden die jeweiligen Taubenserren einpipettiert. Als Antigen wurde eine 1%-ige Lösung des S. gall.-Rohextraktes verwendet.

3.3 Versuchsanordnung und Durchführung

3.3.1 Vorversuch

Im Vorversuch sollte ermittelt werden, ob der Rohextrakt aus S. gallinarum an Tauben oral und parenteral verabreicht eine Immunantwort auszulösen imstande ist. Dazu wurden 2 Tiere in 3-tägigem Abstand 5 Injektionen von 250 µg bis 4 mg Trockensubstanz (in log₂-Schritten ansteigend) i.m. appliziert. 2 Tiere wurden zweimal, am 1. Tag i.m., am 9. Tag s.c., mit 2 mg TS vakziniert. 2 weitere Tiere wurden oral täglich mit 4 mg TS immunisiert. 2 Kontrolltiere erhielten 5 Injektionen sterile BHI-Lösung. Die Antikörper-Produktion wurde in den Seren durch OSA nach Blutentnahme am 16. Tag untersucht.

3.3.2 Hauptversuch

Im Hauptversuch sollte untersucht werden, ob die Verabreichung des Spaltantigens aus S. gallinarum an Tauben nach heterologem Challenge mit STC eine Schutzwirkung induziert.

Es wurden 3 Gruppen zu je 15 Tieren gebildet, wobei jeweils 10 Tiere vakziniert wurden und die restlichen 5 als Kontrollen dienten.

In Gruppe I wurden 8 Tiere parenteral und 2 oral vakziniert, die Belastung erfolgte mit 3×10^8 STC-Keimen.

In Gruppe II wurden alle 10 Tiere oral vakziniert; die Belastung erfolgte mit 2×10^9 lebenden STC-Keimen.

Gruppe III wurde simultan parenteral und oral vakziniert, bei einer Belastung von 1×10^8 lebenden STC-Keimen.

Die Versuche wurden im zeitlichen Ablauf nacheinander durchgeführt.

Der Challenge erfolgte am 21. Versuchstag mit den bereits genannten Keimzahlen.

Die Entnahme von Blut- und Kloakentupfern erfolgte am 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9., 14. und 21. Tag p.Ch., Tötung und Organentnahme am 22. Tag p.Ch.

Vor Versuchsablauf verendete Tiere wurden noch am selben Tag untersucht.

Die Überprüfung des Impfschutzes wurde klinisch, serologisch (OSA, LA) und kulturell (Nachweis von Salmonellen in Blut, Kot und Organen) durchgeführt.

Immunisierungsschema Hauptversuch

Gruppe	Tierzahl	Immunisierung	Menge	Tag
I	8	parenteral	250µg/500µg/1mg/2mg	1/4/7/11/15
	2	oral	i.m. 4 mg	1-20 tgl.
	5	-	-	-
II	10	oral	4 mg	1-20 tgl.
	5	-	-	-
III	10	oral/parenteral	4mg/2mg	oral tgl./1 im., 7 im., 14 s.c.
	5	-	-	-

4. Ergebnisse

4.1 Latextest

Es wurden verschiedene gereinigte pFlg aus STC-Isolaten und S. heidelberg sowie ungereinigte Rohextrakte aus STC-Isolaten, S. gallinarum und S. heidelberg untersucht.

Es zeigte sich, daß in den gelchromatographisch gereinigten polymeren Flagellinen lediglich die unspezifische H-Antigenphase 1,2 (bzw. 2) nachzuweisen war, während die H-Antigeneigenschaften der ungereinigten Rohextrakte weit über die des jeweiligen Ausgangstammes hinausreichten, wobei jedoch die spezifische Phase durch das Extraktionsverfahren regelmäßig verloren ging.

Einige Antigenstrukturen sind regelmäßig vorhanden (a, b, enx, gm, gp, lv, d), einige andere sind dagegen nie nachzuweisen (c, p, t, v, z, z₂₉, i, 6).

Bei modifizierter Herstellung des Rohextraktes (ungekühlt, ohne Neutralisation, ohne Polymerisationskatalysator etc). bleiben immer nur die Antigenstrukturen gm und gp erhalten. Bei basischer Extraktion (pH 11) waren keinerlei Antigeneigenschaften mehr festzustellen.

Der Rohextrakt aus unbegeißeltem (und damit nach KAUFF-MANN-WHITE H-antigenfreien) S. gallinarum zeigte die Antigenstrukturen gm, gp und m (auch im OSA-Test nachgewiesen).

Einzelergebnisse siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

Einzelergebnisse Latextest																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Rohantigenextrakte bzw. gereinigte pFlg aus:																				
Salmonella Test-Serum Anti-H	STC, 20 gereinigt	STC, 21 gereinigt	STC, 22 gereinigt	S.heidelberg "	STC, 20 roh	STC, 21 roh	STC, 22 roh	STC, 16 roh	STC, 17 roh	STC, 38 roh	STC, 7, 4mg/ml roh	STC, 7, 1mg/ml roh	S.gallinarum roh	S.heidelberg roh						
a					+	+	+	+	+	+	+	+		+						
b					+	+	+	+	+	+	+	+		+						
c																				
d					+	+	+	+	+	+	+	+		+						
eh							+		+	+	+	+								
enx					+	+	+	+	+	+	+	+		+						
f							+													
gn					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
gp					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
i																				
k					+		+		+	+	+	+		+						
lv					+	+	+	+	+	+	+	+		+						
m					+		+		+	+	+	+	+	+						
p																				
q					+		+		+	+	+	+		+						
r					+	+	+		+	+	+	+								
s					+		+	+	+	+	+	+		+						
t																				
v																				
w					+		+	+	+		+	+		+						
y					+		+		+	+	+	+		+						
z																				
z ₆					+															
z ₁₀					+		+			+	+	+								
z ₁₃					+	+		+	+	+	+	+		+						
z ₁₅						+									+					
z ₁₈					+		+	+	+						+					
z ₂₉																				
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+						
5					+		+								+					
6																				
7					+		+		+	+	+	+								
1,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+						

4.2

Biochemische Untersuchungen

Bei den Elektrophorese-Versuchen zeigte sich, daß die untersuchte Substanz (Rohextrakt) weder bei der konventionellen noch bei SDS-Gelelektrophorese (Porengröße 5.000 D) nachzuweisen war.

Auch die zweidimensionale Elektrophorese/Fokussierung (Titrationskurve) brachte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ebenso konnte bei Elektrofokussierungen in pH-Bereichen zwischen 3 und 10, wobei die Molekülgröße unberücksichtigt bleibt und nur die Ladung bzw. der pk-Wert des Moleküls zur Reaktion führt, der untersuchte Rohextrakt nicht identifiziert werden.

Der Proteinnachweis gelang qualitativ durch die Biurettreaktion, die bei Polypeptiden ab 4 Aminosäuren als sicher gilt.

Quantitativ konnte die Substanz durch Ionenaustauscherharze auf Basis der Ninhydrinreaktion am Max-Planck-Institut für Biochemie identifiziert werden (manueller Edman-Abbau).

Die Aminosäurezusammensetzung ergab 32 AS ohne Cystein, Methionin und Tryptophan. Das Verhältnis der rein sauren AS zu den rein basischen AS beträgt 6:1, genauer siehe Tabelle 2. Bei vorheriger Dünnschicht-Cellulose-Elektrophorese zu Reinigungszwecken wurde festgestellt, daß in der Trockensubstanz noch ca. 1 % LPS und Lipid-Reste vorhanden sind.

Die verwendete Technik gibt nur über die Aminosäuresequenz eines Proteins Auskunft, d.h. das untersuchte Protein enthält die erwähnten 32 AS oder ein Vielfaches davon. Nach der biochemischen Faustregel:

Anzahl der AS eines Proteins $\times 100$ = näherungsweise dem MGW in Daltons, liegt das kleinste mögliche Vielfache des

untersuchten Proteins bei ca. 6.400 D und hätte im "Molekularsieb" Elektrophorese, Porengröße 5.000, entdeckt werden müssen. Man kann somit davon ausgehen, daß die ermittelten 32 AS der tatsächlichen Molekülgröße entsprechen und daß das MGW des extrahierten Proteins bei etwa 3.200 Daltons liegt.

Das Säure-Basenverhältnis der nicht überwiegend amphotheren AS spricht für einen stark sauren Charakter des Proteins mit extrem niedrigen pk-Wert (kleiner als 3,5). Es konnte daher außerhalb des möglichen pH-Bereiches auch bei der Isoelektrischen Fokussierung nicht als Bande erscheinen.

Tabelle 2

Aminosäuresequenz des Proteinextraktes aus *S. gallinarum*

<u>Aminosäure</u>	<u>Reaktion</u>	<u>Anzahl</u>
Alanin	amphoter	3
Arginin (basisch)		1
Asparagin (sauer)		2
Cystein	"	0
Glycin	"	7
Glutaminsäure (sauer)		4
Histidin	"	1
Isoleucin	"	1
Leucin	"	2
Lysin	"	1
Methionin	"	0
Rhenylalanin	"	1
Prolin	"	3
Serin	"	2
Threonin	"	1
Tryptophan	"	0
Tyrosin	"	1
Valin	"	2
Summe:		32

4.3 Immunfluoreszenz

Die durch den *S. gallinarum*-Rohextrakt induzierten und FITC-markierten Antikörper zeigten brillante Fluoreszenz und bipolare Anlagerung an das homologe Vollantigen von *S. gallinarum* (Bild 1).

Gegen das heterologe Antigen von STC 36 (Bild 2) ließen sich Fluoreszenz und bipolare Anlagerung noch gut, jedoch nicht mehr überdeutlich darstellen.

Die Negativkontrolle (Bild 3) zeigte lediglich diffuse Hintergrundhelligkeit ohne erkennbare Einzelheiten.

Immunfluoreszenz

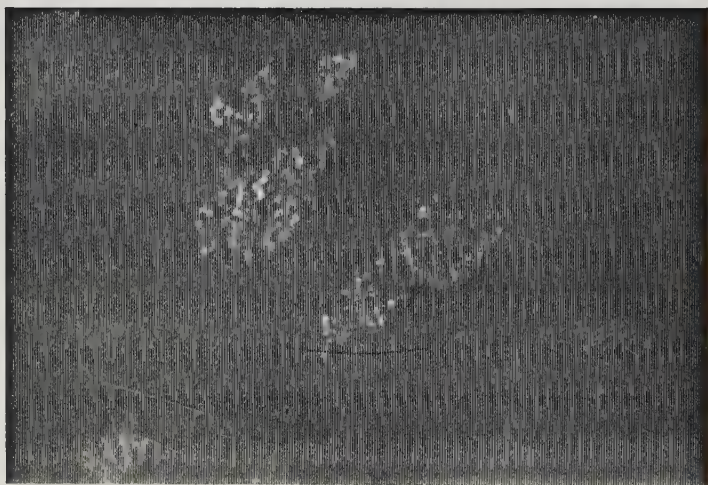


Bild 1: Homologes Antigen (S.gall.) vergr. 1200-fach

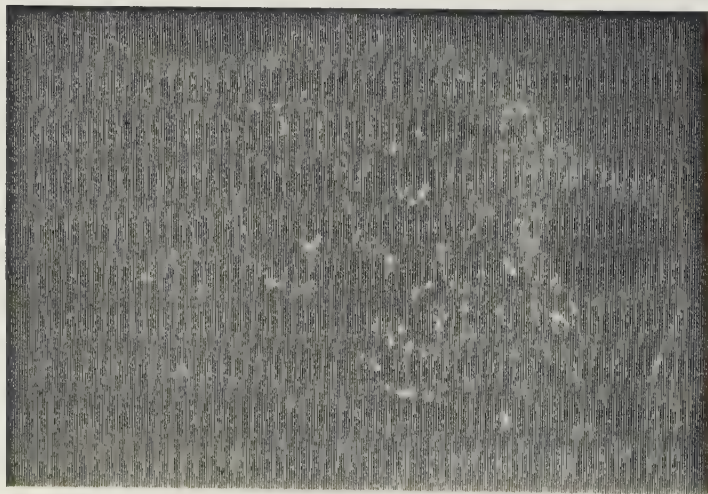


Bild 2: Heterologes Antigen (STC 36) vergr. 1200-fach

Immunfluoreszenz

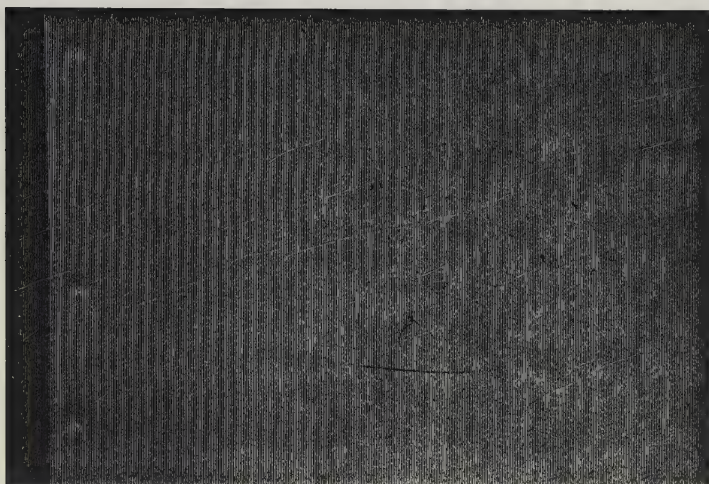


Bild 3: Negativ-Kontrolle

4.4 Vorversuch

Bei den 5 x steigend parenteral vakzinierten Tieren konnten im Serum gegen alle getesteten Stämme Antikörper nachgewiesen werden, wobei der homologe Titer gegen *S. gallinarum*-Antigen mit 1:512 am höchsten ausfiel.

Bei den 2 x mit gleicher Dosis parenteral vakzinierten Tieren konnten ebenfalls gegen alle Teststämme AK nachgewiesen werden, jedoch mit deutlich niedrigeren Titern, wobei der Titer gegen den homologen Stamm mit jeweils 1:32 ebenfalls am höchsten ausfiel (Tabelle 3).

Die oral geimpften Tiere sowie die Kontrollgruppe zeigten keine AK im Serum.

Es wurden keine feststellbaren Unverträglichkeiterscheinungen gegen das verabreichte Protein beobachtet. Für die Immunfluoreszenz wurde das Serum der Taube Nr. 2 verwendet.

Einzelergebnisse siehe Tabelle 3.

Tabelle 3

Serum-Antikörper-Aktivität der mit S. gall.-Rohextrakt
parenteral vakzinieren Tiere

Aggl.Stamm	Taube 1 5xvakz.	Taube 2 5xvakz.	Taube 3 2xvakz.	Taube 4 2xvakz.	Taube 5,6 oral	Taube 7,8 Kontrolle
STC 22	1:32	1:32	1:4	1:2	-	-
STC 36	1:64	1:128	1:8	1:2	-	-
STC 38	1:8	1:8	1:1	-	-	-
S.gall.	1:512	1:512	1:32	1:32	-	-
S.senften- berg	1:64	1:32	1:2	1:4	-	-
S.reading	1:16	1:32	1:1	1:1	-	-
S.straßbourg	1:32	1:32	1:4	1:4	-	-
S.typhi T2	1:128	1:64	1:16	1:8	-	-
S.typhi T4	1:128	1:64	1:16	1:8	-	-

Ermittlung der Titer per Objektträgerschnellagglutination,
Serumverdünnungen mit PBS

4.5 Hauptversuch

4.5.1 Gruppe I

Nach der Belastung mit 3×10^8 lebenden STC-Keimen kam es bei den 8 i.m. vakzinieren Tieren und den 5 Kontrolltieren über den gesamten Untersuchungszeitraum zu Bakteriämie, Ausscheidung über den Kot und Organbesiedelung. Lediglich bei den 2 oral vakzinieren Tieren waren zu keinem Zeitpunkt Salmonellen im Blut nachweisbar; aus dem Kot waren ab dem 5. Versuchstag keine Salmonellen mehr zu isolieren und die 2 Tiere zeigten nach der Tötung am 21. Tag als einzige keinen Organbefall.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Gruppe II nur oral vakzinieren und mit der relativ hohen Challengedosis von 2×10^9 lebenden STC-Keimen oral belastet, um evtl. wirtsspezifische Resistenzfaktoren wie Ernährungszustand, Alter, Streßempfindlichkeit etc. auszuschalten.

4.5.2 Gruppe II

Die 5 Kontrolltiere starben zwischen dem 7. und 12. Tag p. Ch. unter manifesten klinischen Erscheinungen (blutiger Durchfall, Apathie etc.). Von den 10 geimpften Tieren überlebten 9 den Challenge bis zum Versuchsende am 21. Tag. Ein Tier starb am 5. Tag p. Ch. Bei 2 Tieren kam die Infektion nicht zum Haften. Bei den 7 anderen ließen sich längstens bis zum 5. Tag Salmonellen im Blut und bis zum 7. Tag im Kot nachweisen. Alle Tiere zeigten jedoch bei der abschließenden Sektion Organbefall in Leber und Herz,

wobei diese Isolate kulturmorphologisch stark verändert erschienen (kleinere Kolonien als die typspezifischen, Oberfläche rauh, jedoch keine echte Rauhform). Bei der serologischen Überprüfung von jeweils 20 Einzelkolonien der Isolate wurde merkwürdigerweise immer die vollständige STM-Antigenstruktur nachgewiesen (O,1, 4, 5, 12 H i; 1,2). Die für R-Stämme zu erwartende Autoagglutinabilität in physiologischer NaCl wurde jedoch nicht festgestellt. Die STC-Minusvariante (ohne O 5-Antigen) des verwendeten Belastungsstammes konnte kein einziges Mal gefunden werden.

4.5.3 Gruppe III

Die Tiere wurden nun oral und parenteral vakziniert, die Belastung erfolgte nur noch mit 1×10^8 STC-Keimen. Es zeigte sich mit einer Ausnahme, daß die Infektion bei der Impfgruppe im Gegensatz zu der Kontrollgruppe nicht mehr zum Haften kam. Die Organisolierung dieses einen Tieres der Impfgruppe zeigte ähnliche kulturmorphologische Veränderungen wie bei Gruppe II und wies ebenso das O 5-Antigen auf.

Bei den restlichen 9 Tieren konnten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs Salmonellen aus Blut, Kot oder Organen isoliert werden.

Die 5 Kontrolltiere starben zwischen Tag 9 und Tag 16 p.Ch.

5. Diskussion

Ausgehend von der einleitenden Fragestellung kann festgestellt werden, daß die im Latextest untersuchten Rohextrakte, im Gegensatz zu den gereinigten polymeren Flagellinen, weit über die des jeweiligen Ausgangstammes hinausreichende H-Antigeneigenschaften aufweisen. Bemerkenswert erscheint hier, daß in allen untersuchten Extrakten, auch in dem aus, nach KAUFFMANN-WHITE H-antigenfreien, *S. gallinarum* gewonnenen, die H-Antigen Strukturen gm und gp nachzuweisen waren.

Es spricht einiges dafür, daß es sich hier, zumindest partiell, um Fimbrienantigen-Anteile handelt.

ALEKSIC¹ et al. zeigten schon 1978, daß verschiedene *S. arizonae* III Stämme mit den H-Antigenformeln c:k mit einem polyvalenten H-Antiserum, das hauptsächlich Antikörper gegen gm, gp und enx, nicht jedoch gegen c u. k enthielt, agglutinierten. Er führte dies auf heterologe Proteinkomponenten zurück, die möglicherweise im Fimbrienapparat ihren Sitz haben.

Ähnlich dem von ALEKSIC¹ et al. (1978) beschriebenen Aggregationsphänomen, bei durch Homogenisation gewonnenem Fimbrienprotein, konnten bei der Lösung von *S. gall.*-Rohextrakt bei Zimmertemperatur nach kurzer Zeit grobflockige reversible Ausfällungen beobachtet werden. Ebenso gelang es nicht, durch Absättigung der Faktorenseren Anti-H gm und Anti - H gp mit der Trockensubstanz aus *S. gall.*-Rohextrakt, eine vollständige Inagglutinabilität der Antikörper gegen das Antigen des entsprechenden Stammes (*S. enteritidis*, gm/*S. dublin*, gp) zu erreichen.

Der Einwand, die Polyvalenz, der im Vorversuch durch *S. gall.*-Rohextrakt induzierten Antikörper, könne durch mitextrahierte LPS-O-Antigenanteile erklärt werden, stößt zum einen auf die geringe Menge des Nicht-Proteinanteils (1 %) des Extraktes und die relativ hohen Titer, zum anderen zeigten BARBER u. EYLAN (1976) bei serologischen Untersuchungen, daß die Zucker (Polysaccharide) der O-Antigene von STM und *S. gallinarum* keine Kreuzreaktion aufweisen. Nach ihrer Auffassung handelte es sich bei den Antigenen der Salmonellen, die Kreuzreaktion zeigten, um die freien Proteine bzw. die Proteinanteile ihrer somatischen Antigene.

Die bei der Immunfluoreszenz aufgetretene Bipolarität der Antikörperanlagerung erscheint in diesem Zusammenhang nur bedingt aussagekräftig. Nach DUGUID (1968) können zwar Fimbrien bipolar auftreten, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß sich die Antikörper gegen zellwandständige Matrixproteine richten, die in der promitotischen Phase durchaus an den Polen konzentriert sein können. Ebenso wenig spricht die Polyvalenz der Antikörper für ein bestimmtes Rezeptorantigen. Sowohl Fimbrien (ALEKSIC, 1979), Haupt- und Nebenproteine als auch das Lipid A (SELTMANN, 1982) der gramnegativen Bakterien, insbesondere der verwandten Arten, können absolut gleich aufgebaut sein.

Ob das von STANBRIDGE et al. (1981) bei Mycoplasmen beschriebene Kappenbildungsphänomen (Konzentration der Oberflächenantigene an den Polen) unter bestimmten Voraussetzungen auch auf Salmonellen zutrifft, ist in diesem Zusammenhang als Interpretationsmöglichkeit ebenfalls nicht auszuschließen.

Ebensowenig dürfen die Ergebnisse der Versuche von MÜLLER und Mitarb. (1985) mit zellfreien Kulturfiltraten und BARBER (1980) mit von verschiedenen Spezies auf künstlichen Nährboden synthetisierten Proteinen als Interpretationshilfen außer Acht gelassen werden.

Es ist nicht auszuschließen, daß die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit dem *S. gall.*-Rohextrakt zumindest teilweise auf solche Proteinanteile oder Inhaltsstoffe zurückzuführen sind.

Nach TSANG et al. (1983) entsteht durch saure Desintegration und anschließende Ammoniumsulfatpräzipitation ein heterologes Proteingemisch, daß auch Polysaccharide und Lipide enthält, das sogenannte Barber-Antigen.

Was die bisher besprochenen Untersuchungen betrifft, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die Aussagen von BARBER u. EYLAN (1979) und SCHLECHT u. BHATNAGAR (1985) hinsichtlich der größeren immunologischen Wirksamkeit von Rohextrakten gegenüber gereinigten Teilkomponenten durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden können.

Inwieweit die H-Antigenstrukturen gm und gp auf Fimbrienantigene zurückzuführen sind, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden und bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Insbesondere vergleichende proteinchemische Untersuchungen verschieden behandelter Rohextrakte sowie ähnliche Untersuchungen an durch Homogenisation aus *S. gall.* gewonnenen Spaltprodukten könnten hier zu weiteren Aufschlüssen führen.

Bei den Vakzinierungsversuchen konnten polyvalente Antikörper mit zum Teil bemerkenswerten Titern durch den parenteral verabreichten S. gall.-Rohextrakt erzielt werden. Diese Antikörper waren jedoch nicht in der Lage eine nennenswerte Schutzwirkung hervorzurufen. Ähnliche Ergebnisse werden auch von anderen Autoren berichtet (KRÄMER, 1983; SILVIA et al., 1981).

Durch die orale tägliche Verabreichung relativ hoher Antigenmengen konnte hingegen eine deutlich meßbare Schutzwirkung erreicht werden.

Im Gegensatz zu KRÄMER (1983), der (ohne Schutzwirkung) polymeres Flaggelin, MGW 94.000, gelöst bei einem pH von 7.2, Tauben oral verabreichte, liegt der gegenteilige Effekt bei vorliegender Untersuchung wahrscheinlich im niedrigen pH der verwendeten Lösung (dem Milieu des vorderen Verdauungstraktes der Taube angepaßt) und der relativ geringen Größe des Moleküls.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse kann gefolgert werden, daß die von AWAD-MASALMEH et al. (1985) und ALLEN u. PORTER (1975) nach Versuchen an Ferkeln und Kälbern getroffenen Schlußfolgerungen, bedingt auch für das Versuchstier Taube, Geltung haben:

Demnach führen oral aufgenommene Impfstoffe primär zur Ausbildung einer lokalen Immunität im Dünndarm. Diese Immunität ist von der Beschaffenheit der verabreichten Antigene abhängig. Oral applizierte Bakterienantigene führen zur Bildung und vorübergehenden Persistenz sekretorischer Antikörper, vor allem der IgA-Klasse und zur Aktivierung von

IgA-, IgM- und IgG-tragenden Immunozyten in der Lamina propria der Dünndarmschleimhaut. Die sekretorischen Antikörper verhindern die Haftung der Bakterienzellen und die Resorption der von diesen gebildeten Enterotoxine. Außerdem wurde bei vakzinierten im Gegensatz zu nicht immunisierten Tieren eine Herabsetzung der Empfindlichkeit des Dünndarms gegen Enterotoxine beobachtet. Antikörper, die gegen Haftantigene gerichtet sind, beschleunigen bei den Erregern auch deren Eliminierung bzw. der sie determinierenden Plas-mide (LINGGOOD u. INGRAM, 1978).

Inwieweit die bei den eigenen Versuchen erzielte Immunität nur auf sekretorische Antikörper oder auch auf aktivierte Makrophagen und Lymphozyten oder ein Zusammenwirken dieser Faktoren zurückzuführen ist, bleibt festzustellen. Fest steht jedoch, daß das immunologische Gedächtnis der Schleimhäute nur von kurzer Dauer ist (ALLEN u. PORTER, 1975). Es ist darum nicht auszuschließen, daß die Ausscheidung bei den betreffenden Tieren nur unterbrochen, nicht abgebrochen ist; zumal das plötzliche Ausbilden des O 5-Antigens möglicherweise einen Abwehrmechanismus des Keimes gegen das Immunsystem darstellt. Außerdem ist zu bedenken, daß Salmonellen in nicht aktivierten Makrophagen lange Zeit fakultativ intrazellulär parasitieren können (SUTER, 1956). Trotz allem scheint jedoch ein weiterer gangbarer Weg in Richtung der Immunprophylaxe der Taubensalmonellose aufgezeigt worden zu sein.

Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen unter Praxisbedingungen bleibt jedoch in Frage gestellt.

Zum einen steht die nur kurzfristig anhaltende Immunität der Schleimhäute einer praxisorientierten Anwendung im Wege, zum anderen bleibt die Wirkung schlecht kontrollierbar verabreichter größerer Antigenmengen über das Trinkwasser an größere Tierzahlen weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6. Zusammenfassung

Durch saure Hydrolyse aus verschiedenen Salmonella-Spezies gewonnene Rohextrakte wurden mit Hilfe eines modifizierten Latextestes auf H-Antigenstrukturen untersucht.

Die biochemische Untersuchung der Rohextrakte ergab eine kleinmolekulare Struktur sowie einen stark sauren Charakter der hauptsächlich aus Protein bestehenden Substanz.

Nach oraler und parenteraler Applikation wurde die Immunantwort und die Schutzwirkung eines solchen Extraktes aus *S. gallinarum* (O 1, 9, 12; H -, -) an der Taube (*Columba livia*, Gmel. 1789 var.dom.) überprüft. Die parenteral induzierten humoralen Antikörper zeigten in der Immunfluoreszenz bipolare Anlagerung an die Bakterienzelle, vermittelten jedoch keine meßbare Schutzwirkung bei den Versuchstieren nach oralem heterologem Challenge mit unterschiedlichen Keimzahlen (1×10^8 - 2×10^9 lebenden *S. typhim. var. cop.*). Bei den oral vakzinieren Tieren konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine deutliche Schutzwirkung hinsichtlich der klinischen Parameter Infektionshaftung, Krankheiterscheinungen und Ausscheidungsdauer festgestellt werden.

On the protection of low molecular proteinous antigens prepared from the surface of *Salmonella gallinarum* against infection with *Salmonella typhimurium* var.cop. in pigeons.

Summary

Crude extracts of different salmonella species prepared by acid hydrolysis were examined for H-antigenstructures using a modified latex test.

The biochemical analysis of crude extracts showed that the substance which consisted primarily of proteins had a low molecular weight and a high acidity.

Following oral and parenteral administration to pigeons (*Columba livia*, Gmel. 1789 var.dom.) the immune response and the protective properties of an extract from *S. gallinarum* (O 1, 9, 12; H -, -) were tested. The parenterally induced antibodies showed a bipolar attachment to the bacterial cell by immunofluorescence, but they did not confer measurable protective qualities in experimental animals after heterologous challenge with varying concentrations of bacterial organisms (1×10^8 - 2×10^9 living *S. typhimurium* var.cop.). With orally vaccinated pigeons a true protective effect in comparison to nonvaccinated controls could be demonstrated by using the clinical parameters of infectious adherence, manifestations of illness and duration of bacterial excretion.

Ensayo sobre eficacia protectora de antígenos proteicos micromoleculares de la superficie de *Salmonella gallinarum* contra la infección con *Salmonella typhimurium* var. copenhagen de la paloma (*Columba livia*, Gmel. 1789, var. dom.)

Resumen

Se analizaron extractos crudos obtenidos de diferentes especies de *Salmonella* por hidrólisis ácida usando una prueba modificada de "Latex" para diferenciar las estructuras antigénicas proteicas superficiales.

El analisis bioquímica de los extractos crudos mostró que la sustancia consiste de una estructura micromolecular con carácter ácido y composición principal de proteínas.

Se midieron la respuesta inmunológica y la eficacia protectora de un extracto preparado de *Salmonella gallinarum* (O 1, 9, 12, H -, -) aplicandolo oral y parenteral a palomas.

Los anticuerpos humorales provocados por aplicación parenteral se fijaron bipolarmente a la superficie de las celulas bacterianas homólogas y heterólogas (*Salmonella typhimurium* var. copenhagen), pero no proporcionaron ninguna protección inmunológica despues de un desafío con *Salmonella typhimurium* var. copenhagen (1×10^8 - 2×10^9 germenes vivos). Despues de vacunación oral se observó una protección comprobada respecto a los parámetros infecciosidad, síntomas clínicas y duración de eliminación de *Salmonella*.

7. Literaturverzeichnis

- Aleksić, S. Serologische Verwandtschaft der Fimbrienantigene bei Salmonellen
Rhode, R.
Aleksić, V. Subgenus I-Yersinia enterocolitica einerseits und Salmonella Subgenus II-Arizona andererseits
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 241,
418-426 (1978)
- Aleksić, S. Neues Fimbrienantigen als Ursache der
Rhode, R. vollständigen O-Inagglutinabilität verschiedener Arizona-Stämme
Aleksić, V.
Müller, G. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 241,
427-437 (1978)
- Aleksić, S. Reindarstellung und physik. chemische
Aleksić, V. Analyse des Fimbrien-Antigens bei zwei verschiedenen Enterobacteriaceae:
Salmonella enteritidis und Yersinia enterocolitica
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig., A 243,
177-196 (1979)
- Allen, W.D. Localisation of immunoglobulins in
Porter, P. intestinal mucosa and the production of secretory antibodies in response to intraruminal administration of bacterial antigen in the preruminant calf.
Clin.Exp.Immunol.21, 407-418 (1975)

- Anonym Klinisches Labor
E.Merck, Darmstadt, 12.Aufl. (1974)
- Anonym Difco Manual
Difco Laboratories, 10.Ed.,
Detroit Michigan, USA (1984)
- Awad-Masalmeh, M. Untersuchungen zur Immunprophylaxe
Sagmeister, H. der Colidiarrhoe des Absetzferkels
Willinger, H. Zbl.Vet.Med.B, 32, 751-758 (1985)
- Bailey, W.R. Diagnostic microbiology
Scott, E.G. Mosby Company, 2.Ed., St. Louis
USA (1966)
- Barber, C. Heterologer Impfschutz bei exp. er-
Eylan, E. zeugter Salmonellose
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 230,
452-457 (1975)
- Barber, C. Die Hauptantigene der Salmonellen:
Eylan, E. Proteine
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 234,
53-59 (1976)
- Barber, C. Erzeugung präzipitierender Antikörper
Eylan, E. durch mit S. gallinarum infizierte
Hühner
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 237,
207-212 (1977)

- Barber, C. Die zahlreichen "Common Antigens" der
Eylan, E. Enterobakteriaceen
 Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 244,
 251-259 (1979)
- Barber, C. Gründe der Unwirksamkeit von Impfstof-
 fen aus getöteten S. typhi
 Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 246,
 184-190 (1980)
- Bellamy, J.E. Immune-mediated emigration of neutro-
Nielsen, C.u.N.O. phils into the lumen of the small in-
 testine
 Infect.Immun. 9, 615-619 (1974)
- Bhatnagar, N. Infektionsschutz gegen STM im Mäusever-
Müller, W. such durch Immunisierung mit Proteinen
Schlecht, S. von Salmonella-R-Mutanten
 Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 253,
 88-101 (1982)
- Bienenstock, J. Mucosal Immunity
Befus, D.A. Monogr. Allergy, 6, 1-18, Karger,
Mc Dermott, M. Basel (1980)
- Birnschein, E. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
Herrmann, R. fähigen Mikroorganismen oder ihren Anti-
Kolb, J.J. genen
Brehmer, W. 15.Mitteilung: Immunogenität von Fraktio-
Raettig, H.J. nen der S. typhimurium-Bakterien im Mäu-
 seschutzversuch (1972)

- Börger, K. Aspekte der Salmonellosebekämpfung im Bereich der Landwirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Nutzen-Kosten-Analyse
Zbl.vet.Med.B, 32, 505-525 (1985)
- Brinton, C.C. Non-Flagellar Appendages of Bacteria
Nature 183, 782-786 (1959)
- Bulling, E.
Helmuth, R. Pathogenitätsmechanismen bei Salmonellen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 99, 025-027 (1986)
- Busche, R. Zum Nachweis von Kompl.bild. und präzip. Antikörpern gegen Chlamydia psittaci bei Haustauben nach exp. Infektion und in Taubenbeständen
Vet.Med.Diss.Gießen (1986)
- Chandran, N.J.D.
Moses, J.S.
Dorairajan, N.
Balaprakasam, R.A. Cell mediated immune response in chicks against Salmonellosis
Cheiron 12, 294-297 (1983) India
- Collins, F.M. Salmonellosis in orally infected specific pathogen-free
C 57 B1 mice
Infect. Immun. 5, 191-198 (1972)
- Collins, F.M. Vaccines and cell-mediated immunity
Bacteriol-Rev. 38, 371-402 (1974)
- Devriese, L.
Devos, A. Immunity to salmonellosis in pigeons
Vtaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 51, 281-289 (1982)

- Duguid, J.P. The Function of Bacterial Fimbriae
Arch. Immun. Therap. Exp. 16,
173-188 (1968)
- Dumonde, J.C. Lymphokines: Non-antibody mediators
Wolstencroft, G.S. of cellular immunity generated by
Panayi, G.S. lymphocyte activation
Matthew, M. Nature, 224, 38-44 (1969)
Morley, J.
Howson, W.T.
- Ek, K. Titration curves: Combined Electro-
focusing-Electrophoresis in PAG
LKB, Application Note 319, (1981)
- Fehrström, H. SDS and Conventional PAG Electrophore-
Moberg, U. sis with 2117 Multiphor
LKB, Application Note 306 (1977)
- Fey, H. Eine neue Methode zur Herstellung von
Suter, M. Salmonellen-Flagellen-Antigen als Im-
munogen für die Produktion von H-Seren
Zbl.Bakt.Hyg.I., Abt.Orig. A 243,
216-225 (1979)
- Grimm, F. Institut für Geflügelkrankheiten,
LMU, München
persönliche Mitteilung (1985)

- Heukeshoven, J. Vereinfachte und universelle Methode
Dernick, R. zur Silber-Färbung von Proteinen in
Polyacrylamidgelen:
Bemerkungen zum Mechanismus der Silber-
Färbung
LKB, Applikation Note RE-O34, S. 92-97
- Hörter, R. Orale Immunisierungsversuche an Tauben
mit S.T.C.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 56-60
(1971)
- Hornick, R.B. Typhoid Fever: pathogenesis and immu-
nologic control
New Eng. J.Med. 283, 739-746 (1970)
- Kauffmann, F. Über serologische und kulturelle
Varianten der Paratyphus B- und
Mäusetyphus-Bacillen
Z.Hyg. 116, 368 (1934)
- Kirchner, A. Experiments on the influence of oral
Hellmann, E. immunization against salmonellosis,
with killed bacterial suspensions, on
the immune system and the immune re-
sponse.
Fortschritte der Vet.Medicine 35,
182-189 (1982)
- Kösters, J. Verlauf der Salmonellose in Broiler-
Beständen und Legehennen-Haltung
Europ. Geflügelkonferenz der WPSA,
Hamburg, Vol. I, 172-177 (1980)

- Kordes, J. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder
Kordes, B. ihren Antigenen. 12. Mitteilung
Pichl, H. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 217,
Ganze, B. 242-253 (1971)
Raettig, H.J.
- Krämer, K. Tentative Untersuchungen zur Impf-
prophylaxe mit gereinigtem Flagellin
aus Salmonella t.c. bei Tauben und
Hähnen
Vet.Med.Diss., München (1983)
- Linggood, M.A. The effect of oral immunization with
Ingram, P.L. heat stable coli antigens on the sen-
sitivity of pigs to enterotoxins
Res.Vet.Sci. 25, 113-115 (1978)
- Lüderitz, O. Immunochemistry of O and R antigens of
Staub, A.M. Salmonella and related Enterobacteria-
Westphal, O. ceae
Bact.Rev. 30, 192-255 (1966)
- Lüthgen, W. Salmonellen bei verwilderten Stadttauben
in Frankfurt a.M.
Dtsch.Tierärztl.Wsch. 73, 205-207 (1966)
- Mäkelä, P. Role of O-Antigen (LPS) Factors in the
Valtonen, V.V. Virulence of Salmonella
Valtonen, M. J. of Inf.Dis., 128, 81-85 (1973)

- Margni, R.A. Agglutinating and non-agglutinating
Parma, E.A. antibodies in rabbits inoculated with
Cerone, S. a particulate antigen (STM)
Erpelding, A. Immunology 48, 351-359 (1983)
Perdigón, G.
- Mayr, A. Virologische Arbeitsmethoden Band II
Bachmann, P.A. Gustav Fischer Verlag, 1. Aufl.,
Bibrack, B. Stuttgart (1977)
Wittmann, G.
- Le Minor, L. Bergey's Manual of Systematic Bacterio-
logy
IV. Ed., Williams and Wilkins, Baltimore
427-458, USA (1984)
- Mitsuhashi, S. Studies on experimental typhoid
Kawahami, M. A comparative study of living and killed
Yamaguchi, Y. vaccines against infections of mice with
Nagai, M. S. enteritidis
J. exper. Med. 28, 249-258 (1958)
- Mitsuhashi, S. Experimental salmonellosis:
Sato I. Intracellular growth of S. enteritidis
Tanaka, T. ingested in mononuclear phagocytes of
mice and cellular basis of immunity
J. Bacteriol. 81, 863-868 (1961)

- Müller, E.
Sonnenschein, B.
Petzoldt, K. Tierexperimentelle Untersuchungen
Über die Beeinflussung der nicht-
erregerspezifischen Abwehr durch
Stoffwechselprodukte von E. coli
Zbl.Vet.med. B 32, 744-750 (1985)
- Müller, G. Kleintiere der menschlichen Siedlung
als Träger von Salmonellen
Zbl.Bakt.Hyg.I., 222, 907-912 (1970)
- Müller, W.
Schlecht, S.
Westphal, O. Schutzversuche gegen STM an Mäusen
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt.Orig. A 248,
64-80 (1980)
- Ocklitz, H.W.
Mochmann, H.
Schmidt, E.F.
Hering, L.
Markuse, I. Laboratoriumsversuche über die Möglich-
keiten einer oralen Immunisierung mit
einem Natriumdesoxycholat-Extrakt aus
Dyspepsiecoli-Stämmen
Zbl.Bakt.Hyg., A 205, 502-509 (1967)
- Oye, E. van
Borghijs, J. Spielen Tauben bei humanen Infektionen
durch STC eine Rolle?
Dtsch. tierärztl. Wschr. 86, 306-307
(1979)
- Padmanaban, V.D.
Mittal, K.R. Cell free antigens as immunising agents
against Salmonella infections in mice
and chicks
Cheiron 8, 252-255 (1979) India

- Plant, J.E.
Wilson, B.M.
Glynn, A.A.
The protein-lipopolysaccharid complex
extracted with trichloroacetic acid
from STM effective in protection of
mice against STM infection
Parasite Immunology, 4, 259-271 (1982)
- Pietzsch, O.
Zusammenstellung der in Deutschland
zwischen 1970-1979 aus Wirtschafts-
geflügel, Wild- u. Zoovögeln isolier-
ten Salmonellen-Spezies
Europ. Geflügelkonferenz der WPSA,
Hamburg, Vol. I, 168-171 (1980)
- Pietzsch, O.
Blobel, H.
Schließer, T.
Handbuch der bakteriellen Infektion
bei Tieren
Gustav Fischer Verlag, 1. Auflage,
Stuttgart 1981
- Raettig, H.-J.
Die orale Impfung mit inaktivierten
Mikroorganismen
Zehn Jahre Forschungsarbeit im
Robert-Koch-Institut
Bundesgesundheitsblatt, 11,
141-147 (1971)
- Raettig, H.-J.
Steffen, R.
Schubert, J.
Orale Immunisierung mit nicht vermeh-
rungsfähigen Mikroorganismen oder
ihren Antigenen
16. Mitteilung
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 225,
263-272 (1973)

- Ramirez Vargas, J.F. Preparacion de un antígeno
Salmonella gallinarum-pullorum
y comparacion con el antígeno
nacional
Tesis de Grado, med.vet., 9-13,
Valdivia, Chile (1976)
- Ribi, E. Endotoxic and antigenic fractions
Milner, K.C. from the cell wall of Salmonella
Perrine, T.D. enteritidis. Methods for separa-
tion and some biologic activities
J. Immunol. 82 (1959) 75
- Robertsson, J.A. STM infection in calves: specific
Fossum, C. immune reactivity against O-anti-
Svenson, S.B. genic polysaccharide detectable in
Lindberg, A.A. in vitro assays
Inf. and Imm., 37, 728-736 (1982)
- Rolle, M. Mikrobiologie, Infektions- und
Mayr, A. Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, 5. Auflage,
Stuttgart (1985)
- Rohde, R. Neue serologische Untersuchungen
über die Problematik der Salmonella
H-Antigene i und r
Zbl.Bakt.Hyg., I.Orig. 174,
315-326 (1959)

- Schickle, H.P.
Horneff, F. Ultradünnschicht-Isoelektrische
Fokussierung, LKB, Application
Note SD 221701 (1983)
- Schlecht, S.
Ferber, E.
Fromme, I. Untersuchungen zur Fettsäurezu-
sammensetzung von Lipiden bei
Salmonella typhimurium-S-und R-
Formen
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 245,
476-484 (1979)
- Schlecht, S. Aktive Immunisierung gegen experi-
mentelle Salmonellose in der Maus
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 249,
362-372 (1981)
- Schlecht, S.
Bhatnagar, N. Infektionsschutz gegen STM im
Mäuseversuch, hervorgerufen durch
Extrakte aus Salmonella-R-Mutanten
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 251,
196-202 (1981)
- Schlecht, S. Infektionsschutz gegen S. typhi-
murium im Mäuseversuch
Zbl.Bakt.Hyg. A 257, 414-425 (1984)
- Schlecht, S.
Bhatnagar, N. Proteins from Salmonella R-Mutants
Mediating Protection against Salmo-
nella typhimurium Infection in
Mice
Zbl.Bakt.Hyg. A 259, 367-377 (1985)

- Schulze, H.-J.
Jaschinski, C.
Raettig, H.-J.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
17. Mitteilung
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 225, 273-278 (1973)
- Seltmann, G.
Die bakterielle Zellwand
Gustav Fischer Verlag, 2. Auflage
Stuttgart (1982)
- Silva, E.N.
Snoeyenbos, G.H.
Weinach, O.M.
Smyser, C.F.
Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chicken
Av.Dis. 25, 38-52 (1981)
- Stanbridge, E.
Bretzius, K.
Good, R.
Mycoplasma-Lymphocyte Interactions
Isr. J.Med.Sci 17, 628-632 (1981)
- Suter, E.
Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms
Bacteriol.Rev. 20, 94-132 (1956)
- Sziegoleit, A.
Sekretorische Immunglobuline und Serumantikörper nach STM-Infektion der Maus
Z. Immun.-Forschung, 152, 244-259 (1976)
- Tanaka, Y.
Katsube, Y.
Infectivity of *Salmonella typhimurium* for mice in relation to fimbriae
J.J. of Vet. Sc., 40, 671-681 (1978)

- Tanaka, Y.
Katsube, Y.
Mutoh, T.
Imaizumi, K.
- Fimbriae of STM and their role in mouse intestinal colonization of the organism
J.J. of Vet. Sc., 43, 51-62 (1981)
- Tanaka, J.
- Multiplication of the fimbrate and non fimbrate Salmonella typhimurium organisms in the intestinal mucosa of mice treated with antibiotics
J.J. of Vet.Sc., 44, 523-527 (1982)
- Tsang, R.S.W.
Lui, S.W.L.
Chan, P.Y.
- Antigenanalyse des aus S. typhi gewonnenen Barber-Protein-Antigens sowie Nachweis von proteinspezifischen Antikörpern in Seren von Typhuspatienten
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 254, 244-252 (1983)
- Vogel, K.
- Taubenkrankheiten
VEB Dtsch. Landwirtschaftsverlag
Berlin, DDR, 4. Auflage (1983)
- Winter, A.
Ek, K.
Andersson, U.B.
- Analytical Elektrofocusing in Thin Layers of Polyacrylamide Gels
LKB, Application Note 250 (1977)
- World Health Organisation
- Oral enteric bacterial vaccine
W.H.O.Tech.Rep.Sev. 500 (1972)

Wuthe, H.-H.

Untersuchungen über Typen
der STM bei Haustauben in
Schleswig-Holstein und ihre
mögliche epizootologische Be-
deutung
Berl. Münch. Tierärztl. Wsch. 84,
290-292 (1971)

8. Tabellarischer Anhang

HAUPTVERSUCH

GRUPPE I

Impfung: parenteral/oral

Belastung: 3×10^8

SALMONELLENACHWEIS IM BLUT

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	parenteral								oral	
Tag										
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
21	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
Tag					
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+

HAUPTVERSUCH

GRUPPE I

Impfung: parenteral/oral

Belastung: 3×10^8

SALMONELLENACHWEIS IM KOT

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	parenteral								oral	
Tag										
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
Tag					
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+

HAUPTVERSUCH

GRUPPE I

Impfung: parenteral/oral

Belastung: 3×10^8

ORGANISOLIERUNGEN NACH

VERSUCHSENDE

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	parenteral								oral	

ORGANE

Leber	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Herz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Niere	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Darm	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
Leber	+	+	+	+	+
Herz	+	+	+	+	+
Niere	+	+	+	+	+
Darm	+	+	+	+	+

HAUPTVERSUCH

GRUPPE II

Impfung: oral

Belastung 2×10^9

SALMNACHWEIS IM BLUT

Impfgruppe

Tier Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tag

1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
4	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
5	XX	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-
21		-	-	-	-	-	-	-	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5

Tag

1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+
7	+	-	XX	-	+
9	XX	-		-	XX
14		XX		XX	
21					

verstorben an Tag: 9 12 7 12 10

HAUPTVERSUCH

GRUPPE II

Impfung: oral

Belastung 2×10^9

SALM. NACHWEIS IM KOT

Impfgruppe

Tier Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tag

1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
4	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
5	xxx	-	-	-	+	+	-	-	-	+
7		-	-	-	+	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-
21		-	-	-	-	-	-	-	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5

Tag

1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	xxx	+	+
9	xxx	+		+	xxx
14		xxx		xxx	
21					

verstorben an Tag:

9 12 7 12 10

HAUPTVERSUCH

GRUPPE II

Impfung: oral

Belastung: 2×10^9

AGGL. AK IM SERUM (OSA)

IMPFGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tag

1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	xx	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	+	-	-	-	-	-
14		+	+	-	+	+	-	+	-	-
21		+	+	+	+	+	-	+	-	+

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5

Tag

1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	+	+	-	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	xx	+	+
9	xx	+		+	xx
14		xx		xx	
21					

verstorben an Tag : 9. 12. 7. 12. 10

HAUPTVERSUCH

GRUPPE II

Impfung: oral

Belastung: 2×10^9

LANGSAMAGGL. AK IM SERUM (IA)

IMPFGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tag

1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	xx	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
14	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
21	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+

xx = vor Versuchsende verstorben

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5

Tag

1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
7	-	-	xx	-	-
9	xx	+		+	xx
14		xx		xx	
21					

verstorben an Tag: 9 12 7 12 10

HAUPTVERSUCH

GRUPPE II

Impfung: oral
Belastung: 2×10^9
ORGANISOLIERUNGEN NACH
VERSUCHSENDE

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ORGANE

Leber	+	⊕	+	⊕	+	+	-	⊕	-	⊕
Herz	+	⊕	+	⊕	+	+	-	⊕	-	⊕
Niere	+	-	+	-	+	+	-	⊕	-	-
Darm	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

⊕ = Kulturmorphologisch stark verändert, 0 5 - Antigen vorhanden

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
----------	---	---	---	---	---

Organe

Leber	+	+	+	+	+
Herz	+	+	+	+	+
Niere	+	+	+	+	+
Darm	+	+	+	+	+

HAUPTVERSUCH

GRUPPE III

Impfung: parenteral und oral

Belastung: 1×10^8

SALM. NACHWEIS IM BLUT

IMPFGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tag

1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr. 1 2 3 4 5

Tag

1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	xx	+	+	+
14	xx		+	xx	+
21			xx		xx

verstorben an Tag: 13 9 15 11 16

HAUPTVERSUCH

GRUPPE III

Impfung: parenteral und oral

Belastung: 1×10^8

SALM.NACHWEIS IM KOT

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Tag

1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
----------	---	---	---	---	---

Tag

1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	XX	+	+	+
14	XX		+	XX	+
21			XX		XX

verstorben an Tag:	13	9	15	11	16
--------------------	----	---	----	----	----

HAUPTVERSUCH

GRUPPE III

Impfung: parenteral und oral

Belastung: 1×10^8

ORGANISOLIERUNGEN NACH VER-
SUCHSENDE

IMPFGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ORGANE

Leber	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Herz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Darm	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

⊕ = Kulturmorphologisch stark verändert, 0 5 - Antigen vorhanden

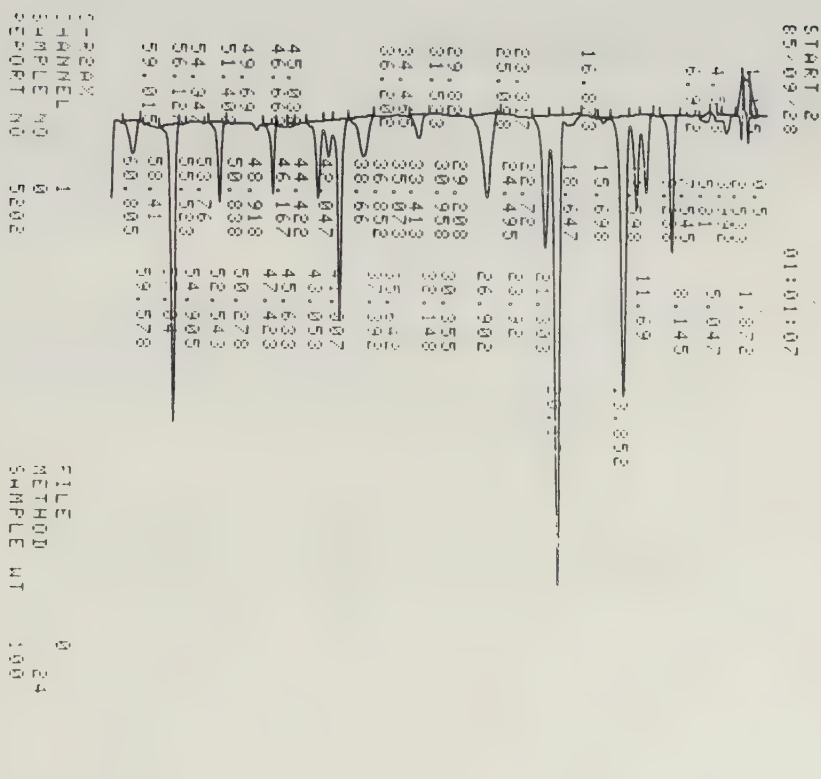
KONTROLLGRUPPE

Tier Nr.	1	2	3	4	5
----------	---	---	---	---	---

Leber	+	+	+	+	+
Herz	+	+	+	+	+
Niere	+	+	+	+	+
Darm	+	+	+	+	+

GERÄTEAUSDRUCK

AMMINOSÄURENSEQUENZ



Bei Herrn Prof. Dr.J. Kösters möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die immer gewährte Betreuung und Unterstützung und die zahlreichen Anregungen im Verlauf der Untersuchungen bedanken.

Herrn Dr. D.Schneegans (Max-Planck-Institut f. Biochemie, Martinsried) danke ich für die Durchführung der Aminosäuresequenzanalyse.

Frl. Barbara Lindner danke ich für die technische Assistenz und für manchen kreativen Beitrag bei den Analysen und Untersuchungen.

Allen ständigen und zeitweiligen Mitarbeitern des Institutes, besonders Frau Priv.Doiz.Dr.Dr. habil.Helga Gerlach, Prof. Dr. E.Stauber (Moscow, Idaho, USA) und Frau I. Rößek sei herzlich gedankt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Verlobten, Fräulein Monika Mayer, für ihr Verständnis und ihre Hilfe bei der Abfassung des redaktionellen Teils der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Uwe Kirsch geboren am 1. April 1955
 in Karlsruhe

Eltern Dr. Michael Kirsch
 Oberstaatsanwalt i.R.
 Lieselotte Kirsch, geb. Dressler
 Hausfrau

1962-1966 Neumayerschule/Frankenthal, Pfalz

1966-1974 Albert-Einstein-Gymnasium,
 Frankenthal

Mai 1974 Reifeprüfung

1973-1977 Ausbildung und Tätigkeit als Ten-
 nistrainer im Tennisverband Rhl.-
 Pfalz-Saar

1977-1978 Grundwehrdienst in Oberlahnstein/
 Rhl.Pf.

1978-1984 Studium der Tiermedizin in München

März/April 1984 Staatsexamen und Approbation

Seit Mai 1984 Wissenschaftliche Hilfskraft am
 Inst. f. Gefl. Krankheiten der LMU
 (halbe Stelle)

